

# Die Wirkung von S-Ketamin auf das thalamokortikale Netzwerk

Von Marie Charlotte Henzler

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

Die Wirkung von S-Ketamin auf das thalamokortikale Netzwerk

von Marie Charlotte Henzler  
aus Hamburg  
München 2020



**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie**

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von:** Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

**Angefertigt am:** Klinikum Rechts der Isar der TU München

In der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

**Mentor:** Prof. Dr. med. Rainer Haseneder



**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent: Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 25.07.2020



Meinen Eltern gewidmet





## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Anästhesie .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Definition .....	3
<b>2.</b>	<b>Das Injektionsanästhetikum Ketamin .....</b>	<b>4</b>
2.1.	Physikochemische und pharmakologische Eigenschaften .....	4
2.2.	Molekulare Wirkmechanismen .....	4
2.3.	Klinischer Einsatz .....	7
<b>3.</b>	<b>Der anästhetika-induzierte Bewusstseinsverlust .....</b>	<b>10</b>
<b>4.</b>	<b>Das thalamokortikale Netzwerk .....</b>	<b>11</b>
4.1.	Aufbau des Thalamus .....	11
4.2.	Funktion des Thalamus .....	12
4.3.	Aufbau des Kortex .....	14
<b>5.</b>	<b>Konstitution des Membranpotentials .....</b>	<b>14</b>
5.1.	HCN-Kanäle .....	15
5.2.	Wechselbeziehungen zwischen Thalamus und Kortex .....	18
<b>6.</b>	<b>Synaptische Informationsübertragung .....</b>	<b>18</b>
6.1.	Glutamaterge Transmission .....	19
6.2.	NMDA-Rezeptoren .....	19
6.3.	AMPA-Rezeptoren .....	21
6.4.	GABAerge Transmission .....	22
<b>7.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchstiere und Haltung .....</b>	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>Herstellung vitaler Hirnschnitte .....</b>	<b>25</b>
2.1.	Präparation der Schnitte .....	25
2.2.	Infrarotvideomikroskopie .....	27
<b>3.</b>	<b>Elektrophysiologie .....</b>	<b>28</b>
3.1.	Versuchsaufbau .....	28

3.2.	Whole-Cell-Konfiguration .....	29
3.2.1.	Anfertigung der Pipetten .....	29
3.2.2.	Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration .....	30
3.3.	Identifizierung thalamokortikaler Schaltneurone.....	32
3.4.	Messungen an HCN-Kanälen.....	33
3.5.	Strom-Spannungsbeziehung und Membraneigenschaften .....	35
3.6.	GABA <sub>A</sub> -Rezeptor vermittelte spontane postsynaptische Ströme .....	36
4.	<b>Auswertung und Statistik .....</b>	<b>37</b>
IV.	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
1.	<b>Einfluss von S-Ketamin auf die intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen .....</b>	<b>39</b>
2.	<b>Wirkung von S-Ketamin auf HCN-Kanäle.....</b>	<b>44</b>
2.1.	Wirkung von S-Ketamin auf den HCN-Kanal vermittelten Voltage Sag .	44
2.2.	Die Wirkung von S-Ketamin auf den Rebound Burst Delay .....	47
2.3.	Wirkung auf den HCN-Kanal vermittelten Kationenkanal I <sub>h</sub> .....	50
2.4.	Die Wirkung von S-Ketamin auf die Aktivierungskinetik p(V) und die halbmaximale Aktivierung (V <sub>1/2</sub> ).....	52
3.	<b>Wirkung auf die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone .....</b>	<b>55</b>
4.	<b>Die Wirkung von S-Ketamin auf GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Ströme .....</b>	<b>57</b>
4.1.	Die Wirkung von S-Ketamin auf kortikale spontane IPSC.....	57
V.	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
1.	<b>Klinische Relevanz der Ketaminkonzentration.....</b>	<b>62</b>
2.	<b>Die Wirkung von S-Ketamin auf die intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen.....</b>	<b>63</b>
3.	<b>Die Wirkung von S-Ketamin auf den HCN-Kanal vermittelten Voltage Sag und Rebound Burst Delay .....</b>	<b>66</b>
4.	<b>Die Wirkung von S-Ketamin auf den HCN-Kanal vermittelten Kationenstrom I<sub>h</sub> und das Potential der halbmaximalen Aktivierung (V<sub>1/2</sub>) .....</b>	<b>67</b>
5.	<b>Die Wirkung von Ketamin auf die intrinsische Erregbarkeit</b>	

---

	<b>kortikaler Neurone der Lamina IV .....</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>Die Wirkung von S-Ketamin auf spontane GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme.....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Neue Indikationen und Anwendungsregeln für Ketamin .....</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Limitationen der Studie.....</b>	<b>81</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>87</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>89</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>117</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>121</b>



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS:

Abbildung 1: Schematische Darstellung des thalamokortikalen Schaltkreises .....	12
Abbildung 2: Aktivitätsmuster TK-Schaltneurone im Wach- und Schlafzustand.....	13
Abbildung 3: Struktur der HCN-Kanäle .....	17
Abbildung 4: Schematischer Aufbau des NMDA-Rezeptor-Ionenkanal-Komplexes .....	21
Abbildung 5: Versuchsaufbau des Infrarot-Videomikroskops und Gradientenkontrastmethode.....	28
Abbildung 6: Infrarotvideomikroskopiebild eines akuten Hirnschnittpräparats .....	31
Abbildung 7: Typische elektrophysiologische Eigenschaften thalamokortikaler Schaltneurone .....	33
Abbildung 8: Spannungsprotokoll $I_h$ .....	35
Abbildung 9: Strom-Spannungsbeziehungen (IV) .....	36
Abbildung 10: Repräsentative Spannungskurven zur Berechnung der aktiven und passiven Membraneigenschaften .....	40
Abbildung 11: Membranbiophysiological Eigenschaften TK-Schaltneurone unter 5 $\mu$ M S-Ketamin. ....	41
Abbildung 12: Membranbiophysiological Eigenschaften TK-Schaltneurone unter 10 $\mu$ M S-Ketamin .....	42
Abbildung 13: Membranbiophysiological Eigenschaften TK-Schaltneurone unter 30 $\mu$ M S-Ketamin .....	43
Abbildung 14: Die Wirkung von S-Ketamin auf den durch HCN-Kanäle vermittelten Voltage Sag .....	45
Abbildung 15: Die Wirkung von S-Ketamin auf den Rebound Burst Delay .....	48
Abbildung 16: Die Wirkung von S-Ketamin auf den HCN-Kanal vermittelten Kationenstrom $I_h$ .....	51
Abbildung 17: Die Wirkung von S-Ketamin auf das Potential der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ ) .....	53
Abbildung 18: Membranphysiologische Eigenschaften kortikaler Neurone der Lamina IV .....	56
Abbildung 19: Repräsentative Originalspur eines Experiments unter 10 $\mu$ M S-Ketamin .....	58
Abbildung 20: Die Wirkung von S-Ketamin auf sIPSC .....	59

## TABELLENVERZEICHNIS:

Tabelle 1: Zusammensetzung der aCSF zur Präparation der Hirnschnitte .....	26
Tabelle 2: Zusammensetzung der aCSF zur Durchführung der elektrophysiologischen Messungen .....	27
Tabelle 3: Zusammensetzung der „Standard-IZ“, pH= 7,25 .....	30
Tabelle 4: Zusammensetzung der IZ zur Messung der Spontaner inhibitorischer postsynaptischen Ströme, pH= 7,2.....	30



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:**

95 %- KI	95 % Konfidenzintervall
aCSF	artificial cerebrospinal fluid
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
AP	Aktionspotential
AP-5	D (-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
ARAS	aufsteigendes retikuläres aktivierendes Hirnstammsystem
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CNBD	cyclic nucleotide binding domain
EEG	Elektroenzephalogramm
GABA	gamma-Aminobuttersäure
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
i.m.	intramuskulär
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
i.v.	intravenös
IZ	Intrazellulärflüssigkeit
MAC	minimum alveolar concentration
mEPSC	Miniatur exzitatorischer postsynaptischer Strom
mIPSC	Miniatur inhibitorischer postsynaptischer Strom
NBQX	1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PCP	Phencyclidin
RMP	Ruhemembranpotential
RTN	Retikuläres thalamisches Neuron
SEM	Standardfehler
sEPSC	spontaner exzitatorischer postsynaptischer Strom
sIPSC	spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
TK	thalamokortikal
TM	Transmembrandomäne
TTX	Tetrodotoxin
VB	ventrobasal
VPM	ventropostmedialer Nukleus (des Thalamus)



---

VSDI	Voltage-sensitive dye imaging
ZNS	Zentrales Nervensystem

## I. EINLEITUNG

Trotz des routinemäßigen Einsatzes von Anästhetika im klinischen Alltag und der stetigen Verbesserung der Narkoseprotokolle, sind die genauen Wirkmechanismen über die Anästhetika den Bewusstseinsverlust hervorrufen weiterhin nicht vollständig geklärt. Es konnten bereits einige beteiligte Gehirnareale identifiziert werden. Besonders das thalamokortikale Netzwerk scheint eine wichtige Zielstruktur darzustellen (Alkire et al., 2008). Für die meisten Substanzen konnte bereits eine Modulation membranständiger ligandengesteuerter und spannungsabhängiger Ionenkanäle gezeigt werden (Rudolph & Antkowiak, 2004).

Ketamin nimmt eine Sonderstellung unter den Anästhetika ein, da es sowohl amnestisch als auch analgetisch wirkt und klinisch, im Gegensatz zu den anderen verschiedenen Anästhetika, einen Zustand der dissoziativen Anästhesie hervorruft. Da Ketamin selbst in hohen Dosen kaum atem- und kreislaufdepressiv wirkt, wird es in der Humanmedizin vor allem bei schwer traumatisierten Patienten eingesetzt. Aufgrund der zentral erregenden Wirkung, die beim Menschen zu Halluzinationen führen kann, ist die Anwendung in der Humanmedizin jedoch limitiert.

In der Tiermedizin allerdings ist Ketamin das weltweit am weitesten verbreitete Anästhetikum. Es wird als Kurznarkose für diagnostische und therapeutische Eingriffe, sowie zur Einleitung und Aufrechterhaltung einer Allgemeinanästhesie verwendet. Bei größeren chirurgischen Eingriffen sowie für die Aufrechterhaltung der Anästhesie ist die Kombination mit Sedativa, Injektions- oder Inhalationsnarkotika notwendig, da Ketamin zu einem erhöhten Muskeltonus und zu unkoordinierten Muskelkontraktionen führt. Bei Pferden muss Ketamin in Kombination mit Xylazin und Diazepam zum Ablegen und zur Narkoseeinleitung verwendet werden, da es ohne Kombination zu initialen Erregungserscheinungen bis hin zu Krämpfen führt.

In subanästhetischen Dosen wird Ketamin bei Hunden in Kombination mit anderen Analgetika eingesetzt, um die Analgesie in der peri- und postoperativen Phase zu verstärken. Es hat sich außerdem als besonders nützlich für die Behandlung von neuropathischen Schmerzen erwiesen. Bei der Schmerzbehandlung werden niedrige Ketamindosen durch Infusion mit konstanter

Geschwindigkeit verabreicht, üblicherweise als Ergänzung zu anderen Analgetika wie Morphin oder Fentanyl.

Ketamin weist auch auf neuronaler Ebene im Gegensatz zu anderen Anästhetika einige Besonderheiten auf. So erzeugt es eine neuronale Aktivitätssteigerung und hemmt die synaptische Transmission, anders als volatile Anästhetika (z.B. Sevofluran (Campagna et al., 2003)) nicht über eine Potenzierung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-ergen Transmission. Ketamin wirkt über einen Antagonismus der glutamatergen Transmission (Trimmel et al., 2018) und erzeugt den Zustand der dissoziativen Anästhesie (Corssen & Domino, 1966). In der vorliegenden Arbeit soll insbesondere der Frage nachgegangen werden, welche Rolle Ketamin in Bezug auf das thalamokortikale Netzwerk spielt und inwieweit es über eine Modulation thalamokortikaler oder kortikaler Neurone eine neuronale Aktivitätssteigerung hervorruft.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Anästhesie**

#### **1.1. Definition**

Der Begriff „Anästhesie“ wurde ursprünglich vom altgriechischen Chirurgen Dioscorides verwendet und später von Dr. Oliver Wendell Holmes wiederbelebt. Holmes beschrieb den Zustand der Unempfindlichkeit, der durch das Einatmen von Äther entsteht, als Anästhesie. Die Allgemeinanästhesie oder Narkose, basiert auf vier Komponenten: Analgesie (Schmerzausschaltung), Amnesie (Gedächtnisverlust), Immobilität (Muskelentspannung) und Hypnose (Bewusstseinsverlust), (Eger & Sonner, 2006). Dabei handelt es sich um einen medikamentös hervorgerufenen, reversiblen Zustand zum Zweck einer operativen oder diagnostischen Maßnahme. Um die jeweilige Dosis der einzelnen Substanzen niedrig zu halten und sich synergistische Effekte zu Nutze zu machen, werden verschiedene Stoffgruppen kombiniert: Opioide zur Schmerzausschaltung, Muskelrelaxanzien zur Immobilisation, Hypnotika und Sedativa zum Bewusstseinsverlust. Anästhetika lassen sich je nach Applikationsart in zwei Gruppen aufteilen: intravenöse verabreichte Anästhetika, häufig eingesetzt zur Narkoseeinleitung und gasförmige Anästhetika, im Allgemeinen zur Aufrechterhaltung der Narkose.

Lange Zeit galt die Lipidtheorie von Hans Meyer und Charles Overton als Erklärung für die Narkosewirkung. Eine unspezifische Interaktion der Anästhetika mit der Lipidmembran wurde als Wirkmechanismus postuliert, wobei die anästhetische Potenz mit ihrer Fettlöslichkeit (Lipophilie) stieg (Meyer 1899; Overton 1901). Diese Theorie wurde von der Proteintheorie zum Teil aufgehoben. Diese beruht auf der Erkenntnis, dass Anästhetika über spezifische Interaktion mit Proteinen ihre Wirkung entfalten (Franks & Lieb, 1978, 1981). Nach heutigem Wissenstand werden proteinbasierte Rezeptoren und Ionenkanäle in verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS) für die unterschiedlichen Dimensionen der Narkose verantwortlich gemacht (Franks & Lieb, 1978, 1981).

## **2. Das Injektionsanästhetikum Ketamin**

Ketamin kommt seit über 40 Jahren in der Human- und Tiermedizin als Narkosemittel zum Einsatz. Unter den anderen Anästhetika nimmt es eine Sonderstellung ein, da es hypnotisierende, analgetische und amnestische Wirkungen erzeugt.

### **2.1. Physikochemische und pharmakologische Eigenschaften**

Chemisch ist Ketamin (2-(2-Chlorphenyl)-2-(methyldamino) cyclohexan-1-on) ein chirales Arylcyclohexylamin mit einem Molekulargewicht von 274,4 g/mol und einem Schmelzpunkt bei 260 Grad Celsius (Peltoniemi et al., 2016). In der Medizin wird sowohl das Razemat bestehend aus dem S- und R-Ketamin als auch das Enantiomer S-Ketamin eingesetzt. Ketamin kann in zwei verschiedenen Aggregatzuständen vorliegen, als weißes kristallines Pulver und als Flüssigkeit. Es ist wasser- und lipidlöslich und kann sowohl intravenös als auch intramuskulär appliziert werden (Sinner & Graf, 2008). Die hohe Lipidlöslichkeit von Ketamin garantiert eine schnelle Passage der Blut-Hirn-Schranke, wodurch wirksame Konzentrationen im Gehirn erzielt werden (Stoelting, 1999). Die Bioverfügbarkeit variiert anhand der Verabreichungsformen: intravenös (100%), intramuskulär (93%), intranasal (25-50%), oral (17%) (Li & Vlisides, 2016). Ketamin wird unter oxidativem Stoffwechsel durch Cytochrom P450(CYP)3A und CYP2B6 zu Norketamin abgebaut. Der Einsatz von S-Ketamin nimmt weltweit zu, da das S-Enantiomer als viermal stärkeres Anästhetikum und Analgetikum postuliert wurde als das R-Enantiomer, etwa zwei Mal effektiver als die razemische Mischung aus Ketamin ist (Peltoniemi et al., 2016) und zu deutlich weniger unerwünschten Nebenwirkungen wie den sog. „Horror Trips“ mit starken psychischen Einschränkungen führt. Bei Hunden wurde unter experimentellen Bedingungen ein Potenzverhältnis von 1:1,3 (Duque et al., 2008) und unter klinischen Bedingungen von 1:1,5 berichtet (Casoni et al., 2015). Die Ergebnisse von Rossetti et al. lassen auf ein ähnliches Potenzverhältnis bei Pferden schließen (Rossetti et al., 2008).

### **2.2. Molekulare Wirkmechanismen**

Trotz ihres etablierten klinischen Einsatzes sind die Wirkmechanismen von Anästhetika noch unzureichend erklärt. Für die meisten Substanzen konnte inzwischen eine Modulation membranständiger ligandengesteuerter und

spannungsabhängiger Ionenkanäle gezeigt werden (Rudolph & Antkowiak, 2004; Franks, 2008). Die meisten volatilen, wie auch intravenös verabreichten Anästhetika potenzieren vorwiegend die inhibitorische synaptische Transmission (Campagna et al., 2003; Kotani et al., 2008), wohingegen Ketamin scheinbar selektiv die erregende synaptische Transmission über einen Antagonismus des N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors hemmt (Trimmel et al., 2018).

Ketamin ist ein nicht kompetitiver NMDA-Rezeptor Antagonist (Lodge et al., 1982; Anis et al., 1983). Eine Wirkung über Dopamin-D2-Rezeptoren, Opiodrezeptoren (Drewniany et al., 2015), sowie über seinen aktiven Metaboliten Norketamin an den 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren werden ebenfalls diskutiert (Du Jardin et al., 2016; Waelbers et al., 2013). Ketamin fungiert zum einen als Kanalblocker über eine effektive Verkürzung der Öffnungszeit, zum anderen als allosterischer Modulator, über eine Reduzierung der Öffnungsfrequenz (Trimmel et al., 2018). Ketamin bindet an die allosterische Phencyclidin (PCP)-Stelle, die sich in der Kanalpore des NMDA-Rezeptors befindet, und blockiert so den Rezeptor nicht-kompetitiv (Kohrs & Durieux, 1998; Mion & Villeveille, 2013). Es wird angenommen, dass die NMDA-Rezeptor-Blockade den dissoziativen anästhetischen und amnestischen Wirkungen von Ketamin sowie den durch das Medikament induzierten antidepressiven, analgetischen und veränderten psychotomimetischen Wirkungen zugrunde liegt (White et al., 1980; Oye et al., 1992; Yeung et al., 2010; Li et al., 2010; Autry et al., 2011; Miller et al., 2014). Ketamin-induzierte kognitive Defizite werden ebenfalls als Folge der NMDA-Rezeptor-Inhibition angenommen (Zanos et al., 2018). S-Ketamin hat im Vergleich zum R-Isomer eine etwa vierfach höhere Affinität/Potenz für die PCP-Stelle des NMDA-Rezeptor und in Gegenwart von extrazellulärem Mg<sup>2+</sup> eine doppelt so hohe Affinität/Potenz wie das razemische Gemisch (Ebert et al., 1997; Kohrs & Durieux, 1998; Moaddel et al., 2013; Zanos et al., 2016; Temme et al., 2018). In Whole-Cell Voltage Clamp Aufzeichnungen wurden die Auswirkungen von S-Ketamin und R-Ketamin auch auf NMDA-Rezeptor aktivierte Kationenströme in kultivierten Hippocampusneuronen der Ratte untersucht (Zeilhofer et al., 1992). Diese Autoren zeigten, dass beide Enantiomere spannungs- und nutzungsabhängige Blockaden der NMDA-Rezeptor-Ströme erzeugten, wobei S-Ketamin etwa doppelt so potent war wie R-Ketamin (Zeilhofer et al., 1992). Darüber hinaus hat S-Ketamin eine 2,5- bis 3-mal höhere Potenz zur Hemmung NMDA-Rezeptor evozierter Ströme in Dorsalhornneuronen

der Katze im Vergleich zum R-Ketamin-Enantiomer (Lodge et al., 1982). Diese höhere Affinität/Potenz des S-Ketamin-Isomers erklärt hypothetisch, warum S-Ketamin ein stärkeres Anästhetikum ist als das Razemat (Yamakura & Shimoji, 1999).

Damit Ketamin am Kanal seine Wirkung entfalten kann, muss dieser geöffnet sein (Sinner & Graf, 2008). Allgemein sind die Kanäle auf hemmenden Interneuronen aktiver als auf Pyramidenzellen, weswegen Ketamin in niedrigen bis mittleren Dosen bevorzugt an NMDA-Rezeptoren auf GABAergen inhibitorischen Interneuronen bindet (Olney & Farber, 1995; Seamans, 2008). Durch die Blockierung des Input zu inhibitorischen Interneuronen werden nachgeschaltete exzitatorische Neurone disinhibiert bzw. aktiver (Brown et al., 2011). Deshalb nimmt der zerebrale Stoffwechsel bei niedrigen Ketamindosen zu. Halluzinationen, dissoziative Zustände, Euphorie und Dysphorie sind bei niedriger Ketamindosis häufig, da Hirnregionen wie Kortex, Hippocampus und Amygdala weiterhin kommunizieren, jedoch mit geringerer Modulation und Kontrolle durch die hemmenden Interneuronen. Informationen werden ohne angemessene Koordination zu Raum und Zeit verarbeitet (Brown et al., 2010; Brown et al., 2011). Die halluzinatorischen Effekte werden wahrscheinlich durch eine Störung der dopaminergen Neurotransmission im präfrontalen Kortex verstärkt, die zum Teil auf eine erhöhte Glutamat-Aktivität an Nicht-NMDA-Glutamat-Rezeptoren zurückzuführen ist (Moghaddam et al., 1997). Die Analgesie resultiert höchstwahrscheinlich aus der Wirkung von Ketamin auf NMDA-Rezeptoren an den dorsalen Wurzelganglien, der ersten Synapse des nozizeptiven Systems im Rückenmark, wo Glutamat der primäre Neurotransmitter ist (Sinner & Graf, 2008). Durch Erhöhung der Ketaminkonzentration werden auch die NMDA-Rezeptoren auf den exzitatorischen glutamatergen Neuronen blockiert und der Bewusstseinsverlust tritt ein (Purdon et al., 2015). Angesichts der Präferenz von Ketamin für NMDA-Rezeptoren auf hemmenden Interneuronen, deren Hemmung zu einer erhöhten zerebralen Stoffwechselrate, einem erhöhten zerebralen Blutfluss und Halluzinationen führt (Cavazutti et al., 1987; Strebel et al., 1995; Vollenweider et al., 1997), ist es nicht überraschend, dass Ketamin mit einem aktivierten Muster im Elektroenzephalogramm (EEG) assoziiert ist.

### 2.3. Klinischer Einsatz

Die Geschichte des Ketamins beginnt in den 1950er Jahren in Detroit, Michigan in den Parke Davis Laboratorien. Am 26 März 1956 synthetisierte Harold V. Maddox Phencyclidin (Maddox et al., 1965). Edward F. Domino untersuchte die Wirkung von Phencyclidin an Tieren und Greifenstein untersuchte 1958 erstmals die Wirkung bei Menschen (Greifenstein, 1958). Das als Sernyl vermarktete Phencyclidin verursachte keine Depressionen der kardiovaskulären und respiratorischen Funktionen, löste allerdings schwere Erregungszustände mit einem sehr langen postoperativen Delirium aus. Trotz seiner hervorragenden analgetischen und amnestischen Potenz wurde nach weiteren klinischen Studien deutlich, dass Phencyclidin nicht für die menschliche Anästhesie geeignet ist. Der Chemiker Calvin Stevens synthetisierte 1962 Ketamin. Es war ein wirkungsvolles Anästhetikum mit deutlich kürzerer Wirkdauer und geringerem Post-Delirium. Das Medikament wurde 1964 von Domino und Corssen an freiwilligen Gefangenen untersucht und die Autoren beschrieben seine Wirkung als „dissoziative Anästhesie“ (Domino et al., 1965). Die Häufigkeit von Nebenwirkungen betrug unter Ketamin nur noch 1/3 und die Probanden beschrieben das Gefühl im Weltraum zu schweben, sowie eine Gefühllosigkeit in den Gliedmaßen (Domino et al., 1965). Eine deutlich höhere hypnotische und analgetische Potenz von S-Ketamin konnte sowohl beim Menschen (White et al., 1985; Klepstad et al., 1990; Doenicke et al., 1992; Freye et al., 1994; Petroianu et al. 1994) als auch bei der Ratte (Marietta et al., 1977; Ryder et al., 1978) im Gegensatz zum Ketaminrazemat und R-Ketamin gezeigt werden. Eine unterschiedliche Rezeptoraffinität der beiden Enantiomere stellt einen möglichen Wirkmechanismus dar (Klepstad et al., 1990; Hustveit et al., 1995). Ketanest-S® wird in der Humanmedizin als Notfallmedikament verwendet und beinhaltet nur das S-Enantiomer.

In den letzten Jahren hat der Einsatz von Ketamin in der Psychiatrie und der Schmerztherapie große Aufmerksamkeit erfahren (Gao et al., 2016). In der Psychiatrie haben sich subanästhetische Dosen Ketamin bereits als eine schnelle und wirksame Behandlung der bipolaren Störung, schweren depressiven Störungen sowie bei Suizidgedanken erwiesen (Coyle & Laws, 2015; Fond et al., 2014; Dewilde et al., 2015; Lee et al., 2015; Price et al., 2014; Rajkumar et al., 2015). Des weiteren hat es sich als wirksam bei der posttraumatischen Belastungsstörung erwiesen (Feder et al., 2014).



1963 wurde Ketamin auch als veterinärmedizinisches Anästhetikum patentiert. Es wird bis heute als gängiges Anästhetikum in der Groß- und Kleintiermedizin zur Narkoseeinleitung verwendet. Es zeichnet sich durch gute Analgesie, den Erhalt vieler Schutzreflexe, aber eine schlechte muskelrelaxierende Wirkung aus (McCarthy et al., 1965; Weisbroth & Fudens, 1972; Glen, 1973).

Ketamin hat sich zum meistverwendeten Anästhetikum in der pferdetierärztlichen Praxis entwickelt. Die Anwendung erfolgt entweder in Verbindung mit einem Alpha-2-Adrenozeptor-Agonisten oder einem zentral wirkenden Muskelrelaxans (Diazepam, Midazolam, Guaifenesin) (Muir, 2010). Die Verwendung von Ketamin als Kurzzeit-Anästhetikum bei Pferden wurde erstmals 1977 beschrieben (Muir et al., 1977). Xylazin (1,1 mg/kg i.v.) wurde vor oder gleichzeitig mit Ketaminhydrochlorid (2,2-6,6 mg/kg i.v.) verabreicht. Die Dosis von Ketamin 2,2 mg/kg i.v. erwies sich als ideal, um eine ausgezeichnete Anästhesie, und eine ausgezeichnete postoperative Erholung bei allen Pferden zu erreichen (Muir et al., 1977). Ketamin verursachte in einer Dosis von mehr als 4,4 mg/kg i.v. zunehmend Muskelzittern und Muskelstarre, Mydriasis, okulogyrischen Bewegungen, Schwitzen, Hypertonie, Tachykardie und erhöhte Rektaltemperatur während der Erholung von der Anästhesie. Es wurde beobachtet, dass die Kombination von Xylazin und Ketamin eine gute bis ausgezeichnete Kurzzeitanästhesie (5-10 Minuten) mit stabiler kardiorespiratorischer Funktion hervorrief, vorausgesetzt, dass eine gute vorangegangene Sedierung mit Xylazin erfolgte und keine zu hohen Bolusdosen von Ketamin verabreicht wurden (Muir et al., 1977). Die klinischen Vorteile der Xylazin-Ketamin-Wirkstoffkombination für die Feldanästhesie wurden anschließend von mehreren Wissenschaftlern innerhalb der nächsten Jahre bestätigt (Butera et al., 1978; Parsons & Walmsley, 1982). Kommerziell findet Ketamin als Razemat in 10%iger wässriger Lösung (Ursotamin®) in der Pferdemedizin weite Verwendung. Da S-Ketamin jedoch eine stärkere anästhetische und analgetische Wirkung und weniger Nebenwirkungen als R-Ketamin hat, wird das reine S-Enantiomer dem razemischen Gemisch vorgezogen und für den klinischen Einsatz bei Pferden in Europa beworben (Filzek et al., 2003; Rossetti et al., 2008; Larenza et al., 2008 & 2009). Eine reduzierte Medikamentendosis, bessere Kontrolle der Anästhesie, sowie eine vorteilhaftere Aufstehphase waren unter S-Ketamin zu verzeichnen (Filzek et al., 2003; Larenza et al., 2009). Auch stabilere physiologische Parameter aufgrund eines stärkeren analgetischen Effekts konnte während

Kastrationen von Hengsten unter Verwendung niedrigerer Dosen S-Ketamin beobachtet werden (Rossetti et al., 2008).

In der Kleintiermedizin kann Ketamin intravenös oder intramuskulär (i.m.) verabreicht werden, um eine Reihe von Wirkungen von der Sedierung bis zur Anästhesie zu erreichen (Hellebrekers, 1996). In Kombination mit Xylazin (0,5-1 mg/kg + Ketamin 10-15 mg/kg i.m.) oder Medetomidin (30-50 µg/kg + Ketamin 3-5 mg/kg i.m. oder 2-4 mg/kg i.v.) kann es zur Einleitung einer Allgemeinanästhesie verwendet werden (Hellebrekers, 1996). Eine alleinige Applikation von Ketamin zur Narkoseeinleitung führt zu erhöhtem Muskeltonus, spontanen Bewegungen und unerwünschten Nebenwirkungen in der Aufwachphase, weshalb es normalerweise zusammen mit Benzodiazepinen gegeben wird. Duque und Kollegen (2008) untersuchten in ihrer Studie die relative Wirksamkeit des Razemats und S-Ketamin auf den hypnotischen Effekt sowie den klinischen Effekt bei äquianästhetischen Dosen bei Hunden. Die Zeit bis zum Erreichen der Brustlage postoperativ, sowie die totale Erholungszeit waren unter S-Ketamin signifikant kürzer. Die Autoren schlussfolgerten, dass das Potenzverhältnis zwischen Ketamin und S-Ketamin bei Hunden kleiner ist als bei anderen Spezies. Eine Dosisreduktion um 50 %, wie sie normalerweise bei Menschen unter Verwendung von S-Ketamin üblich ist, reichte nicht aus, um äquianästhetische Wirkungen bei Hunden zu erzielen (Duque et al., 2008).

Heute gewinnt Ketamin zunehmend an Aufmerksamkeit als Analgetikum, das in Verbindung mit anderen Medikamenten für chirurgische Eingriffe am stehenden Tier oder zur multimodalen Analgesie bei akuten oder chronischen Schmerzen eingesetzt werden kann. Eine einzige subanästhetische Dosis Ketamin (2,5 mg/kg i.m.) bewirkte bei Hunden nach einer Ovariohysterektomie eine kurzzeitige postoperative Analgesie (Slingsby et al., 2000). Wagner et al. (2002) verwendeten niedrige Ketamindosen als Infusion zur Ergänzung postoperativer Analgesie bei Hunden nach einer Vorderbeinamputation. Hunde, die eine Ketamininfusion erhielten, zeigten 12 und 18 Stunden post-OP signifikant niedrigere Schmerzwerte und waren am 3. postoperativen Tag deutlich aktiver als Hunde, die nur eine 0,9 % NaCl-Infusion erhielten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die perioperative Verabreichung niedriger Ketamindosen die Analgesie und das Wohlfühlverhalten der Hunde in der postoperativen Phase erhöhen kann (Wagner et al., 2002).

Das Spektrum der Anwendung von Ketamin ist in der Veterinärmedizin sehr breit gefächert. So findet es nicht nur in der Kleintiermedizin regelmäßigen Gebrauch (Ferreira et. al., 2015), sondern wird auch bei Wild- und Zootieren zur Immobilisation verwendet (Wiesner, 1998). Die sogenannte „Hellabrunner Mischung“ bestehend aus einer Konzentration von ca. 125 mg/ml Xylazin und 100 mg/ml Ketamin, stellt in der Praxis die wohl häufigste gebrauchte Kombination dar. Sie ermöglicht dem Operateur eine schnelle und einfache Handhabung unter Praxisbedingungen (Wiesner, 1998).

### **3. Der anästhetika-induzierte Bewusstseinsverlust**

Mithilfe von Bildgebungsstudien wurde eine Reihe von Hirnarealen identifiziert, die an der Vermittlung des anästhetika-induzierten Bewusstseinsverlustes beteiligt sind. Als wichtige Zielstruktur wurde das thalamokortikale Netzwerk identifiziert (Alkire et al., 2008). Der Thalamus als Schaltstation enthält zum Großteil kortikothalamische Feedback-Fasern (Alkire, 2008). Es gab Kontroversen über die genauen Mechanismen der anästhesiebedingten Bewusstlosigkeit, mit zwei wesentlichen Ansätzen, die sich herausgebildet haben. Ein prominenter Ansatz ist das "Bottom-Up"-Paradigma, das argumentiert, dass Anästhetika das Bewusstsein unterdrücken, indem sie Schlaf-Wach-Kerne und neuronale Schaltkreise im Gehirnstamm und Zwischenhirn modulieren, die sich entwickelt haben, um Erregungszustände zu kontrollieren (Mashour & Hudetz, 2017). Ein weiterer Ansatz ist das "Top-Down"-Paradigma, das argumentiert, dass Anästhetika das Bewusstsein unterdrücken, indem sie die kortikalen und thalamokortikalen Schaltkreise modulieren, die an der Integration neuronaler Informationen beteiligt sind (Mashour & Hudetz, 2017).

Ketamin hat eine zentrale Bedeutung für den „Top-Down“-Ansatz, weil es zu einer neuronalen Aktivitätssteigerung führt aber dennoch die funktionelle Konnektivität im kortikalen Netzwerk inhibitiert (Mashour, 2014). Mashour und Hudetz (2017) kommen zu der Folgerung, dass „Bottom-Up“ und „Top-Down“ Mechanismen verschiedene Dimensionen des Bewusstseins regulieren. „Bottom-Up“ unterdrückt den Grad des Bewusstseins und „Top-Down“ beeinflusst den Inhalt des Bewusstseins. Ebene und Inhalt sind zwei Aspekte des Bewusstseins, die sowohl konzeptionell als auch empirisch voneinander abgegrenzt werden können (Laureys, 2005). Konzeptionell bezieht sich das auf den Grad des

Bewusstseins. Der Inhalt des Bewusstseins bezieht sich auf das, was subjektiv in einem bestimmten Moment erlebt wird (Dehaene & Changeux, 2011). Empirisch kann die Bewusstseinssebene durch das Vorhandensein von Augenöffnungen, gezielte Reaktion auf verbale Befehle, Reaktionszeit oder in einigen Fällen durch eine neurophysiologische Maßnahme beurteilt werden (Mashour & Hudetz, 2017).

Zuletzt wird die Bedeutung des Thalamus für die Aufrechterhaltung von Bewusstsein anhand tierexperimenteller Studien in Frage gestellt, in denen Katzen und Ratten der Thalamus entfernt wurde (Villablanca, 2004; Fuller et al. 2011). Athalamische Tiere wiesen in beiden Studien ein aktiviertes Elektroenzephalogramm auf und waren noch zu Interaktionen fähig.

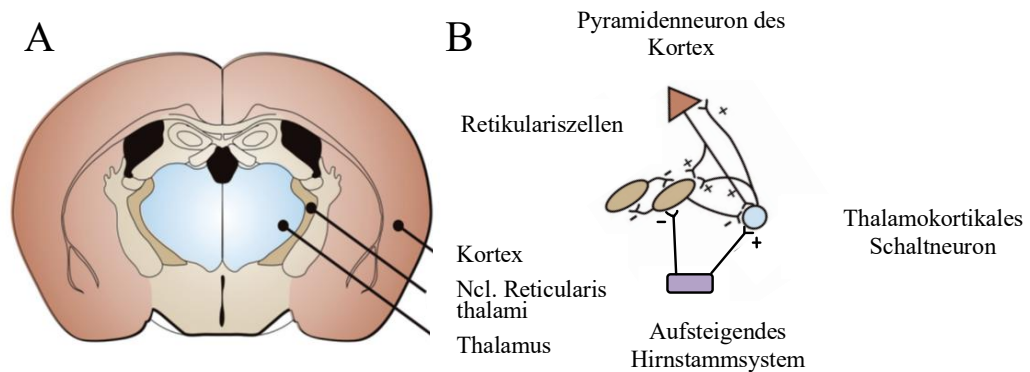
#### **4. Das thalamokortikale Netzwerk**

Der Thalamus ist das zentrale Integrations-, Steuerungs- und Koordinationsorgan sensibler und sensorischer Sinnessysteme. Fast alle sensiblen und sensorischen Informationen werden im Thalamus umgeschaltet und auf verschiedene Kortexareale verteilt (McCormick & Bal 1997; Huguenard & McCormick, 2007). Daher wird der Thalamus auch als „Tor zum Bewusstsein“ bezeichnet (Pape et al., 2005).

##### **4.1. Aufbau des Thalamus**

Der Thalamus bildet den größten Teil des Diencephalons. Über die Adhesio interthalamica sind die beiden anatomischen Hauptstrukturen, die dorsale und die ventrale Hälfte, miteinander verbunden. Die medialen Flächen bilden jeweils die Seitenwand des 3. Ventrikels und die lateralen Flächen grenzen direkt an die Capsula interna. Viele Kerngebiete, die sog. Nuclei, bilden die Gesamtheit des Thalamus. Sie werden aufgrund ihrer Verbindung zum Kortex in spezifische, unspezifische sowie Assoziationskerne eingeteilt (Sinowatz & Hess, 2006). Zu den unspezifischen Kernen mit Projektionen zum Kortex zählt auch der retikuläre thalamische Nukleus (RTN), eine netzartige Kernregion des Thalamus. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Schlaf-Wach-Zustandes und der Aufmerksamkeit. Über GABAerge Verbindungen projiziert er inhibitorisch zu den spezifischen Thalamuskernen. Der Nucleus Retikularis wird afferent inhibitorisch von der Formatio Retikularis gesteuert. Das aufsteigende retikuläre

Aktivierungssystem (ARAS) führt über eine Hemmung der Retikulariszellen zu einer Disinhibition. Daraus folgt eine Aktivierung spezifischer Thalamuskern, die wiederum über Efferenzen den Kortex aktivieren (Mattusch, 2015).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des thalamokortikalen Schaltkreises**

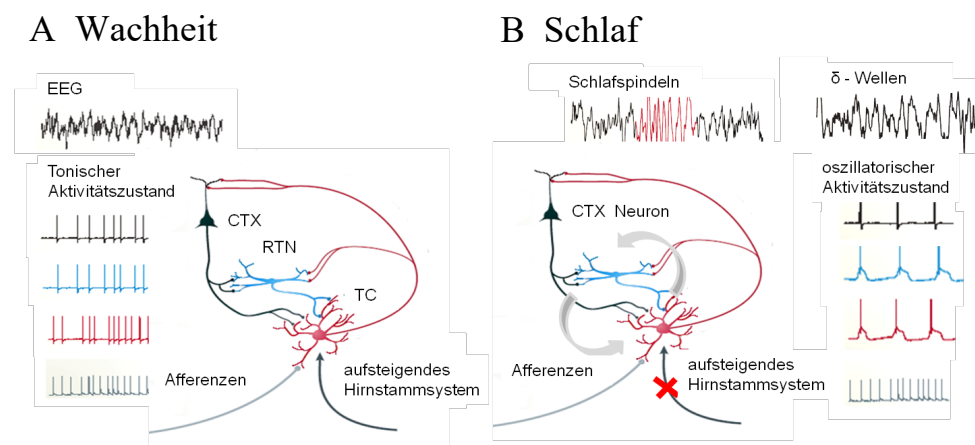
A: Koronarschnitt eines Mäusehirns mit Darstellung des Thalamus, Kortex und Nucleus reticularis B: Schematische Illustration des thalamokortikalen Schaltkreises. + symbolisiert exzitatorische glutamaterge Kontakte; - symbolisiert inhibitorische GABAerge Kontakte. Abb. modifiziert nach Biel & Wahl-Schott, 2009.

#### 4.2. Funktion des Thalamus

Der Thalamus reguliert als Rhythmusgenerator Verhaltenszustände wie Wachheit und Schlaf und wahrscheinlich auch Phasen der Anästhesie (Steriade, 2005). Die Hauptpopulation der thalamischen Neurone bilden die thalamokortikalen (TK) Schaltneurone, auch Relaisneurone genannt. Nahezu alle Sinnessignale, mit Ausnahme des olfaktorischen Systems, werden vom Ort der Reizaufnahme über TK-Schaltneurone in den Kortex weitergeleitet. TK-Schaltneurone können zwei unterschiedliche Funktionszustände einnehmen: während Wachheit bzw. erhöhter Aufmerksamkeit führt die Transmitterfreisetzung aus aufsteigenden spinothalamischen Bahnen zu einer Depolarisation von TK-Schaltneuronen, infolge dessen tonische Salven schneller Aktionspotentiale generiert werden. Letztere stellen eine wichtige Grundlage für sensorische Signalverarbeitung dar (McCormick & Bal, 1997). Während des Schlafs entfällt der erregende Einfluss auf TK-Schaltneurone, resultierend in einer Hyperpolarisation des Membranpotentials. Rhythmisch-oszillatorische Entladungssalven, ein sog. „Burst Modus“ wird generiert und eine Signalweiterleitung weitgehend verhindert (McCormick & Bal, 1997). Im EEG zeichnet sich Wachheit durch eher hochfrequente Muster mit geringer Amplitude aus. Eher langsam-rhythmische

Muster mit Wellen hoher Amplitude kennzeichnen Phasen des Schlafs (Pape et al., 2005, siehe Abb. 2). Die meisten Anästhetika erzeugen ein schlafähnliches EEG-Muster, mit Ausnahme von Ketamin (Franks, 2008). Für Ketamin konnte eine erhöhte neuronale Aktivität im EEG gezeigt werden (Purdon et al., 2015).

Der Wechsel der beiden Funktionszustände wird maßgeblich über das Membranpotential der Thalamusneurone bestimmt. Eine Hyperpolarisation des Membranpotentials leitet den oszillatorischen Zustand ein, während eine Depolarisation den oszillatorischen Modus unterbricht und das tonische Feuern, den Zustand der Wachheit, unter anderem durch die Freisetzung von Neurotransmittern aus dem ARAS, auslöst. Metabotrope Glutamat-, muskarinerge-,  $\alpha$ 1-adrenerge und H1-Rezeptoren werden über die Ausschüttung von Acetylcholin, Noradrenalin, Serotonin, Histamin, Glutamat und verschiedene Neuropeptide aktiviert. Sie bewirken eine Blockierung der Schrittmachermechanismen und eine gesteigerte Depolarisation der Thalamusneurone (Steriade et al. 1990; Steriade 1992; Mooney et al. 1993; Pape et al., 2005).



**Abbildung 2: Aktivitätsmuster TK-Schaltneurone im Wach- und Schlafzustand**

Das Netzwerkschema verdeutlicht zwei geschlossene synaptische Schaltkreise, die rekurrente Netzwerkoszillationen fördern. A: Während Wachheit führen aufsteigende exzitatorische Signale zur Depolarisation von thalamokortikalen (TC) Neuronen (rot) und RTN-Neuronen (blau), was zu Auslösung von einzelnen, tonischen Aktionspotentialen führt. In diesem Zustand werden Informationen von der Peripherie zu kortikalen Neuronen (schwarz) weitergeleitet. B: Nach Wegfall der Depolarisation auf TC-Neurone werden als Folge einer Hyperpolarisation oszillatorische Aktivitätszustände erzeugt (Burst Modus). Die Signalweiterleitung zum Kortex ist gehemmt und im EEG werden die für den Schlaf charakteristischen langsamen Schlafwellen im delta-Frequenzbereich

angezeigt. Beim Übergang von Wachheit zu Schlaf werden im EEG die typischen Schlafspindeln erzeugt. Durch die Entladung von Aktionspotentialsalven von einem TC-Neuron auf ein GABAerges RTN-Neuron entstehen diese Schlafspindeln, da das RTN-Neuron erneut ein postsynaptisches inhibitorischen Potential zurück auf das TC-Neuron sendet. Wiederholte Hyperpolarisation und Entladung von Aktionspotentialsalven erzeugen intrathalamische Oszillationen. CTX: kortikales Neuron; Abb. modifiziert nach Franks (2008).

#### **4.3. Aufbau des Kortex**

Die Großhirnrinde (lateinisch: Cortex cerebri), ist die äußere Schicht des Telencephalons. Das Telencephalon besteht aus zwei Hemisphären, sowie sechs Großhirnloben pro Hemisphäre: der Frontal-, der Parietal-, der Temporal-, der Okzipital-, der Insel- sowie der Limbische Loben. Die einzelnen Loben werden durch Furchen (Sulci) voneinander getrennt und jeweils in Windungen (Gyri) unterteilt. Der Kortex lässt sich in 6 Schichten mit histologisch unterschiedlichen Zelltypen einteilen, die als Lamina I-VI bezeichnet werden (Mountcastle, 1997). Die exzitatorischen Neuronen stellen mit Abstand die Mehrheit (70-80%) aller Neurone im Neokortex dar. Sie lassen sich in Pyramiden- und Sternzellen einteilen (Toledo-Rodriguez et al., 2003). Pyramidenzellen besitzen einen pyramidenförmigen Zellkörper und kommen vor allem in Lamina II-IV vor. Über ihre langen Axone sind sie mit weiteren kortikalen sowie subkortikalen Zellen verbunden (Toledo-Rodriguez et al., 2003). Die Sternzellen sind fast ausschließlich in der Lamina IV vertreten und werden deshalb auch Körnerzellen genannt. Ihre unverzweigten, kurzen Dendriten verleihen ihnen ein sternartiges Aussehen. Die inhibitorisch wirkenden Interneurone machen 20 - 30% der neokortikalen Zellen aus. Da die Neurone der Lamina IV im somatosensorischen Kortex hauptsächlich afferente Eingänge über thalamokortikale Projektionsfasern aus den spezifischen Thalamuskernen erhalten, wurden in dieser Arbeit Neurone der Lamina IV abgeleitet (Sinowatz & Hess, 2006).

### **5. Konstitution des Membranpotentials**

Das Membranpotential hat eine entscheidende Bedeutung für die Aktivitätszustände von TK-Schaltneuronen (McCormick & Bal, 1997). Wie bereits erwähnt erzeugt eine Hyperpolarisation einen oszillatorischen Modus, der mit Schlaf assoziiert wird, und eine Depolarisation den Relaismodus, der mit

Wachheit in Verbindung gebracht wird. Die Konstitution des Membranpotentials wird dabei maßgeblich von sog. „hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated“ (HCN) Kanälen beeinflusst. Diese konnten inzwischen als wichtige Zielstruktur verschiedener Anästhetika identifiziert werden (Mattusch et al., 2015; Ying et al., 2006).

### 5.1. HCN-Kanäle

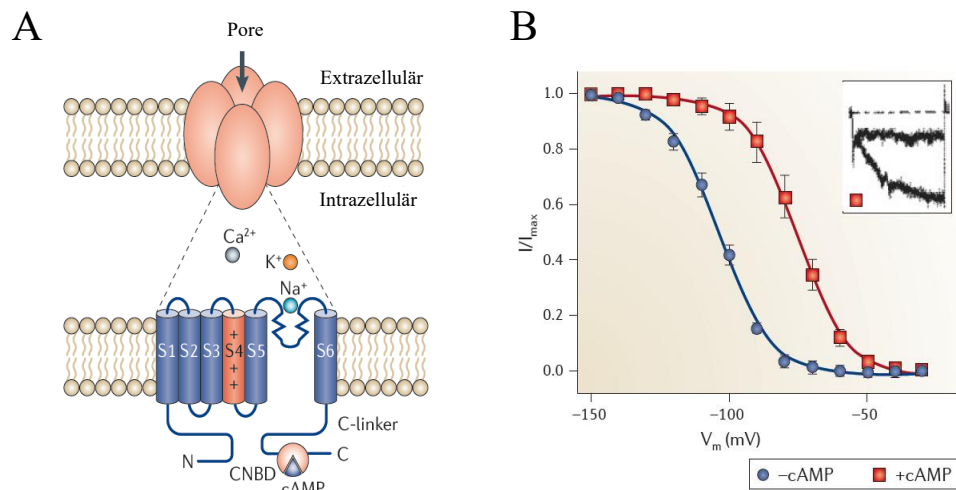
HCN-Kanäle umfassen eine Unterfamilie von Proteinen innerhalb der Überfamilie der Porenschleifen-Kationenkanäle. Bei Säugetieren umfasst die HCN-Kanalfamilie vier Mitglieder (HCN1-4), die im Herzen und Nervensystem exprimiert werden (Santoro et al., 2000; Robinson & Siegelbaum, 2003). Der von den HCN-Kanälen erzeugte Strom wurde aufgrund seiner interessanten biophysikalischen Eigenschaften als  $I_h$  („hyperpolarization-activated“),  $I_f$  („funny“), oder  $I_q$  („queer“) bezeichnet (Pape, 1996). Ähnlich zu spannungsabhängigen Kalium-Kanälen wird ein funktioneller HCN-Kanal als Tetramer von Untereinheiten gebildet. Jede Untereinheit setzt sich aus 6 Transmembransegmenten zusammen, wobei S4 als Spannungssensor dient und auf Änderungen des Membranpotentials reagieren kann (Broomand et al., 2003). Eine porenformende Region, die eine Glycin-Tyrosin-Glycin (GYG) Sequenz enthält, wie sie auch in  $K^+$  selektiven Kanälen gefunden wird, konnte für HCN-Kanäle gezeigt werden. Die Varianz der Aminosäuresequenz außerhalb des Motivs könnte den Durchlass von Natriumionen erklären (Mattusch et al., 2015). Ein weiteres Charakteristikum der HCN-Isoformen ist die Bindungsdomäne am carboxyl terminalen Ende für zyklische Nukleotide (CNBD; cyclic nucleotide binding domain). Bestehend aus einem C-Linker, der anschließenden  $\beta\alpha$  Region, sowie einer C-Helix ist es für die Vermittlung der Reaktion gegenüber cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) beteiligt (Wainger et al., 2001). Vier HCN-Moleküle desselben Isotyps bilden einen homomeren Kanal. Die vier Isoformen können sich aber auch funktionell in verschiedenen Kombinationen zu heteromeren Kanälen mit verschiedenen Eigenschaften zusammenfügen (Robinson & Siegelbaum 2003; Santoro & Baram 2003; Brewster et al. 2005; Biel et al. 2009). Beispielsweise zeigt die überwiegend vorkommende HCN1-Isoform im Kortex und Hippocampus eine deutlich schnellere Aktivierungskinetik und geringere Sensitivität gegenüber cAMP, während die dominierende Isoform HCN2 und HCN4 in thalamischen Nuclei eine langsamere Aktivierungskinetik



und höhere Sensitivität gegenüber cAMP aufweist (Biel et al, 2009, Noam et al, 2011). In der Arbeit von Ludwig et al. konnte die Beschleunigung der Aktivierungskinetik durch die Bindung von cAMP bestätigt werden (Ludwig et al., 1999).

Da HCN-Kanäle im Herzen an der Kontrolle des Herzrhythmus beteiligt sind werden sie auch als „Schrittmacher“-Kanäle bezeichnet. Umfangreiche Studien der letzten Jahrzehnte haben überzeugend belegt, dass  $I_h$  auch an einer Reihe grundlegender physiologischer Prozesse beteiligt ist: Regulierung zellulärer Erregbarkeit (Pape & McCormick, 1989; Thoby-Brisson et al., 2000), synaptischer Transmission und Plastizität (Beaumont & Zucker, 2000; Mellor et al., 2002) sowie der dendritischen Integration (Poolos et al., 2002). Im Gegensatz zu den meisten spannungsgesteuerten Kanälen werden  $I_h$ -Kanäle durch Hyperpolarisierung von Spannungsschritten auf negative Potentiale bis -60 mV aktiviert, welches nahe dem Ruhemembranpotential (RMP) der meisten Zellen liegt.  $I_h$  ist ein gemischter  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Strom, der bei Hyperpolarisation durch einen sigmoidalen Verlauf charakterisiert ist (Biel et al, 2008), aber hauptsächlich durch einen einwärtsgerichteten Natriumfluss vermittelt wird (Brennan et al., 2016).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Regulierbarkeit der HCN-Kanäle durch das intrazelluläre cAMP in thalamokortikalen Relaisneuronen einen wichtigen Mechanismus darstellt, der dem aufsteigenden Hirnstammsystem eine effektive Kontrolle der Oszillationen im thalamokortikalen Netzwerk ermöglicht (Pape, 2005).



**Abbildung 3: Struktur der HCN-Kanäle**

A: Schematische Darstellung von HCN-Kanälen. Sie bestehen aus 4 Untereinheiten, die jeweils aus 6 Transmembransegmenten (S1-S6) aufgebaut sind. Das positive geladene S4 Segment dient als Spannungssensor. Die Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide befindet sich im C-Terminus und ist über eine C-Linker Region mit dem S6 Transmembransegment verbunden. B: Darstellung der Spannungsaktivierung in An- bzw. Abwesenheit von cAMP. Unter dem Einfluss von cAMP beschleunigt sich die Aktivierungskinetik und verschiebt die Kurve zu positiveren Potentialen. Abb. modifiziert nach Postea & Biel, 2011.

## **5.2. Wechselbeziehungen zwischen Thalamus und Kortex**

Nahezu alle sensorischen Informationen gelangen über den Thalamus in den Neokortex. Die Übertragung sensorischer Signale von der Peripherie zum Kortex ist ein dynamischer Prozess, der eine gegenseitige Kommunikation zwischen Kortex und Thalamus beinhaltet (Crandall et al., 2015) und eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung, Kognition und des Schlaf-Wach Zyklus spielt (Jones, 2002). Dabei ist die Anzahl der absteigenden kortikothalamischen Fasern zehnfach höher als die aufsteigenden thalamokortikalen Fasern (Sherman & Koch, 1986). Aufgrund dieser Verteilung ist es naheliegend, dass der Kortex einen starken Einfluss auf die thalamische Aktivität und damit auch auf seinen eigenen sensorischen Input haben muss (Crandall et al., 2015). Die kortikothalamischen Fasern stellen die Hauptquelle für exzitatorischen Einfluss auf thalamische Neurone dar (Destexhe, 2000). TK-Schaltneurone empfangen afferente Signale aus der Peripherie und projizieren zu kortikalen Neuronen, hauptsächlich in den Schichten I, IV und VI (Herkenham, 1980). Die kortikalen Pyramidenzellen der Lamina VI projizieren zum selben Thalamuskern zurück, aus dem sie ihren Input erhalten haben, was in einer „back and forth“ exzitatorischen Verbindung zwischen Thalamus und Kortex resultiert (Jones, 1985; Steriade 1997).

## **6. Synaptische Informationsübertragung**

Die Übertragung und Weiterleitung von Informationen innerhalb des ZNS beruht auf der Fähigkeit von Neuronen miteinander zu kommunizieren. Die interneuronale Kommunikation findet in erster Linie an Synapsen statt, wo Informationen auf zwei unterschiedlichen Übertragungswegen weitergeleitet werden können: über elektrische oder über die weitaus häufiger auftretenden chemischen Synapsen (Pereda, 2014). Bei elektrischen Synapsen liegen die Zellmembranen benachbarter Neurone sehr eng zusammen. Durch sog. Tunnelproteine entstehen „gap junctions“ anhand derer ein Aktionspotential direkt bidirektional und nahezu ohne Zeitverlust überspringen kann. An chemischen Synapsen werden die Informationen über einen Neurotransmitter zur postsynaptischen Membran übermittelt. Der Transmitter wird zunächst in präsynaptischen Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert. Nach Erreichen des

Aktionspotentials kommt es zu einer Spannungsänderung der Zellmembran, woraufhin sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle öffnen und die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt aufgenommen werden. Durch die Verbindung des Transmitter-Rezeptor-Komplexes an der postsynaptischen Membran kommt es zu einer Potenzialänderung. Eine Depolarisation bewirkt eine Erregung, eine Hyperpolarisation eine Hemmung der postsynaptischen Nervenzelle. Der Informationsfluss erfolgt hier nur unidirektional (Thiel & Roewer, 2009). Die wichtigsten Neurotransmitter im ZNS sind Glutamat, welches eine exzitatorische Wirkung vermittelt (Monaghan et al., 1989) und GABA, welches inhibitorisch wirkt (Fahn & Cote, 1968).

### **6.1. Glutamaterge Transmission**

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im ZNS (Monaghan, 1989). Seine Wirkung wird über ionotrope oder metabotrope Rezeptorfamilien vermittelt. Ionotrope Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die sich hinsichtlich ihres Aufbaus sowie ihrer Bindungs-, Aktivierungs- und Leitungseigenschaften weiter differenzieren lassen (Traynelis et al., 2010). Anhand ihrer Präferenz für spezifische Agonisten werden sie in folgende Gruppen unterteilt: N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-,  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)- sowie Kainat-Rezeptoren (Meldrum, 2000). Metabotrope Glutamatrezeptoren sind G-Protein gekoppelt und vermitteln über die Bildung von Second Messenger Substanzen intrazelluläre Signalkaskaden (Niswender & Conn, 2010).

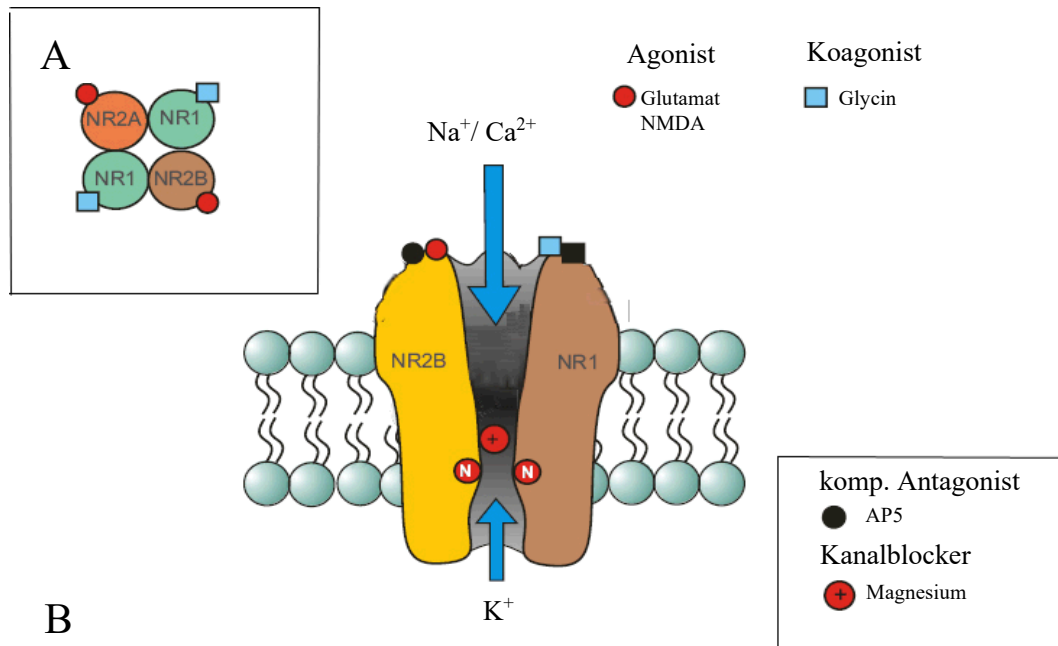
### **6.2. NMDA-Rezeptoren**

Der NMDA-Rezeptorkomplex ist ein postsynaptischer Ionenkanalrezeptor, der maßgeblich an Gedächtnis- und Lernprozessen beteiligt ist und eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität und in pathophysiologischen Prozessen spielt (Dingledine et al., 1999). Er ist für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel (Monaghan et al., 1989) und benötigt zur Aktivierung des Rezeptorkanals sowohl den Agonisten Glutamat, als auch den Koagonisten Glycin (Kleckner & Dingledine, 1988; Clements & Westbrook, 1991). Da extrazelluläres  $\text{Mg}^{2+}$  zu einer nicht kompetitiven Blockade des NMDA-Rezeptorkanals führt, sind für die Aktivierung des Rezeptors bei ruhenden Membranpotentialen gleich zwei auftretende Ereignisse nötig: die präsynaptische Freisetzung und Bindung von Glutamat an

NMDA-Rezeptoren, sowie eine ausreichend starke postsynaptische Membrandepolarisation, die zur Entfernung der  $Mg^{2+}$  Blockade führt (Gonda, 2012). Liegen beide Voraussetzungen vor, kommt es durch die Bindung von Glutamat zur vollständigen Öffnung des  $Ca^{2+}$ -Kanals mit einem Einstrom von  $Ca^{2+}$  in das Zellinnere. Dies bewirkt eine Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger Enzyme. Ein übermäßiger  $Ca^{2+}$ -Einstrom ist möglicherweise an der Glutamatexzitotoxizität beteiligt (Lipton & Rosenberg 1994; Lee et al., 1999; Hardingham & Bading 2003).

Die Hauptfunktion der NMDA-Rezeptoren liegt also eher in der aktivitätsabhängigen Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und somit der Regulation  $Ca^{2+}$ -abhängiger Prozesse, obwohl sie durch die Erzeugung elektrischer Impulse zur erregenden Signalübertragung beitragen.

Der NMDA-Rezeptor ist aus vier verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Cull-Candy et al., 2001). Die Untereinheit NR1 wird von einem Gen kodiert. Durch alternatives Splicen lassen sich 8 verschiedene Splicevarianten der NR1 unterteilen, die sich hinsichtlich ihrer Verteilung und Funktion unterscheiden (Dingledine et al., 1999). Für NR2 existieren die Subtypen NR2A-NR2D und für NR3 die Subtypen NR3A und NR3B. Es müssen zwei NR1-Untereinheiten im tetrameren Komplex vorliegen, um einen funktionellen NMDA-Rezeptorkomplex zu bilden (Rosenmund et al., 1998). Durch die Ergänzung von NR2- und/oder NR3-Untereinheiten entstehen eine Vielzahl verschiedener Kombinationsvarianten. Ein funktioneller NMDA-Rezeptor besteht dementsprechend aus einem NR1/NR2- bzw. NR1/NR3-Heterodimer (Furukawa et al., 2005; Chen & Wyllie, 2006).



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau des NMDA-Rezeptor-Ionenkanal-Komplexes**

A: Der NMDA-Rezeptorkomplex ist aus 4 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Die essentielle NR1-Untereinheit zur Bildung funktioneller Rezeptoren besitzt die Bindungsstelle für den Koagonisten Glycin. NR2 trägt die Bindungsstelle für den Agonisten Glutamat. B: Die zentrale Ionenpore ist aus unterschiedlichen Transmembranproteinen aufgebaut. Extrazelluläres  $\text{Mg}^{2+}$  blockiert den Ionenkanal und wird über eine Membranpolarisation entfernt, wodurch der Kanal für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel wird. Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration löst intrazelluläre Prozesse aus, die sowohl für die neuronale Plastizität als auch für die Glutamatexzitotoxizität verantwortlich sind. Text & Abbildung verändert nach Parsons, 2007; Kratzer, 2012. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elvesier

### 6.3. AMPA-Rezeptoren

AMPA-Rezeptoren sind tetramerische, kationendurchlässige ionotrope Glutamaterezeptoren. Sie werden im gesamten Gehirn exprimiert (Beneyto & Meador-Woodruff, 2004). Die vier AMPA-Rezeptor-Untereinheiten (GluR1-GluR4) werden von den Genen GRIA1-GRIA4 kodiert und als Dimere zusammengesetzt, um heterotetramere Rezeptoren zu bilden (Hollmann & Heinemann, 1994; Traynelis et al., 2010). Jedoch sind auch homotetramere Rezeptoren beschrieben worden (Wenthold et al., 1996; Lu et al., 2009). Nach der Bindung von Glutamat erlaubt die Porenöffnung den Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen

(zusammen mit einem  $K^+$ -Efflux), um das postsynaptische Kompartiment zu depolarisieren. Abhängig von der Zusammensetzung der Untereinheit und der RNA-Editierung erlauben AMPA-Rezeptoren jedoch auch einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom, welches wichtige Konsequenzen für die Plastizität hat, da  $Ca^{2+}$ -abhängige Signalereignisse aktiviert werden.

Die vier AMPA-Rezeptor Untereinheiten sind hochgradig homolog mit transmembranen und extrazellulären Domänen (Collingridge et al., 2004). Die C-terminalen intrazellulären Enden unterscheiden sich in ihren Untereinheiten und alternatives Spleißen und RNA-Editieren tragen zu weiteren Varianten bei. Alternatives Spleißen am so genannten Flip/Flop-Exon erzeugt Untereinheitsvarianten mit ausgeprägten Rezeptordesensibilisierungseigenschaften (Lambolez et al., 1996). Darüber hinaus werden im adulten Gehirn die meisten GluR2-Untereinheiten einer RNA-Editierung unterzogen, bei der in der porenbildenden Region des assemblierten Kanals ein Glutamin durch ein positiv geladenes Arginin ersetzt wird. Diese Q/R-Editierung verhindert den  $Ca^{2+}$ -Influx. Daher sind im adulten Gehirn die Mehrzahl der GluR2-haltigen AMPA-Rezeptoren weitgehend  $Ca^{2+}$ -impermeabel (99%, Greger et al., 2003) und zeigen eine verminderte Einzelkanalleitfähigkeit (Cull-Candy et al., 2006; Traynelis et al., 2010) zusammen mit einer leicht erhöhten Abklingzeit. Im Gegensatz dazu sind GluR2-fehlende AMPA-Rezeptoren  $Ca^{2+}$ -permeabel und haben eine höhere Einzelkanalleitfähigkeit sowie eine schnellere Anstiegs- und Abklingkinetik (Swanson et al., 1997).

#### **6.4. GABAerge Transmission**

GABA ist der am häufigsten vorkommende inhibitorische Neurotransmitter im ZNS. Etwa 30% aller Synapsen verwenden GABA als Transmitter (Bloom & Iversen, 1971). GABA-Rezeptoren üben ihre Wirkungen über ionotrope ( $GABA_A$  und  $GABA_C$ ) und metabotrope ( $GABA_B$ ) Rezeptoren aus (Barnard et al., 1998; Bowery, 2006). Da die meisten physiologischen Wirkungen über  $GABA_A$ -Rezeptoren erzeugt werden, werden nur diese im Folgenden näher beleuchtet. Diese Rezeptoren sind Chloridionenkanäle, die vom Liganden GABA geöffnet werden können und durch eine Vielzahl pharmakologisch und klinisch relevanter Medikamente wie Benzodiazepine, Barbiturate, Steroide oder Anästhetika moduliert werden können (Macdonald & Olsen, 1994; Sieghart, 1995). Der  $GABA_A$ -Rezeptor ist ein Mitglied einer Überfamilie von ligandengesteuerten

Ionenkanälen, zu der auch der nicotinsäurehaltige Acetylcholin-Rezeptor, der 5-Hydroxytryptamin-Typ-3-Rezeptor und der Glycin-Rezeptor gehören. Ähnlich wie die anderen Mitglieder dieser Rezeptor-Superfamilie sind die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aus fünf Untereinheiten zusammengesetzt (Nayeem et al., 1994). Alle GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten bestehen aus einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne, vier Transmembran-(TM) Domänen und einer großen intrazellulären Schleife zwischen TM3 und TM4 (Schofield et al., 1989). Bisher wurden insgesamt 19 Untereinheiten ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  und  $\rho$ 1-3) von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aus dem Nervensystem von Säugetieren kloniert und sequenziert (Whiting et al., 1999; Franks, 2008). Die am häufigsten vorkommende Rezeptorzusammensetzung im ZNS von Säugetieren ist die Kombination von  $\alpha$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 2 (Sieghart & Sperk, 2002; Farrant & Kaila, 2007). GABA bindet extrazellulär an die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (Stephenson, 1995). Dies bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors und Cl<sup>-</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen können den Ionenkanal passieren. Der vermittelte Chloridioneneinstrom beim Öffnen des Kanals erzeugt eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Nervenzelle, welche somit in der Entstehung eines inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) resultiert. Die meisten häufig verwendeten Anästhetika erhöhen die Aktivität der hemmenden GABA-Rezeptoren vom Typ A (GABA<sub>A</sub>), die in zwei Hauptgruppen eingeteilt sind: postsynaptisch und extrasynaptisch (Rudolph & Antkowiak, 2004; Brickley & Mody, 2012).

Postsynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden durch hohe Konzentrationen von GABA aktiviert, die an präsynaptischen Terminalen freigesetzt werden. Diese Rezeptoren erzeugen transiente hemmende postsynaptische Ströme, welche die schnelle Kommunikation zwischen Neuronen regeln. Im Gegensatz dazu werden extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch niedrige Umgebungskonzentrationen von GABA aktiviert. Sie erzeugen einen tonischen hemmenden Strom, der die neuronale Erregbarkeit, die Netzwerksynchronität und das kognitive Verhalten reguliert (Farrant, 2005; Brickley & Mody 2012). Die anästhetischen Eigenschaften von Ketamin werden in der Regel auf die Hemmung von NMDA-Rezeptoren zurückgeführt, es gibt jedoch auch Hinweise auf die Beteiligung anderer Ionenkanäle und Rezeptoren. Ketamin erhöht tonische hemmende Ströme in isolierten murinen Hippocampus- und Kortexneuronen mit minimalen Auswirkungen auf synaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Wang et al., 2005). Darüber hinaus hat Ketamin GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Subtyp-spezifische Effekte, die zu einer



selektiven Potenzierung der extrasynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten tonischen Hemmung führen. Dieser Effekt trägt wahrscheinlich zu den neurodepressiven Eigenschaften von Ketamin bei (Wang et al., 2005).

## **7. Zielsetzung der Arbeit**

Das thalamokortikale Netzwerk wurde als wichtige Zielstruktur für den anästhetika-induzierten Bewusstseinsverlust identifiziert. Trotz zahlreicher Studien konnte der genaue Mechanismus des anästhetika-induzierten Bewusstseinsverlust bisher nur unzureichend geklärt werden. Ketamin zeigt im Gegensatz zu anderen Anästhetika einige Besonderheiten. So beobachtet man unter Ketamin im Gegensatz zu anderen Anästhetika eine neuronale Aktivitätssteigerung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob diese Aktivitätssteigerung auf einem thalamischen oder kortikalen Phänomen beruht.

In dieser Arbeit sollen insbesondere folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie beeinflusst S-Ketamin die intrinsische Erregbarkeit thalamokortikaler Schaltneurone?
2. Wie beeinflusst S-Ketamin spannungsabhängige HCN-Kanäle in thalamokortikalen Schaltneuronen?
3. Beeinflusst S-Ketamin die neuronale Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lamina IV (Haupteingangsstation thalamokortikaler Projektionsfasern)?
4. Wie beeinflusst S-Ketamin die Spontanaktivität kortikaler Neurone der Lamina IV?

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Versuchstiere und Haltung**

Die Organentnahmen erfolgten gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/EU sowie den Paragraphen des deutschen Tierschutzgesetzes, zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Für die Versuche wurden weibliche Mäuse des Stammes C57B16/N im Alter von 4-5 Wochen und einem Mindestgewicht von 15 g aus spezifisch pathogenfreier Zucht (Charles River Biopharmaceutical Services GmbH, Max-Planck-Straße 15a, 40699 Erkrath, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in Gruppen von 2-4 Tieren gehalten. Sie besaßen jederzeit freien Zugang zu Futter (Haltungsdiät für Ratten und Mäuse, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und Wasser. Es herrschte eine Umgebungstemperatur von  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , die Luftfeuchte betrug  $55 \pm 10 \%$  und es wurde ein Tag/Nacht Rhythmus von 12 h gefahren. Die Käfige waren mit je einem roten Unterschlupf aus Polycarbonat (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland), Zellstoff, Nagehölzern und Nestlets (Ancare, Bellmore, New York, USA) als Enrichment ausgestattet. Für jede Messreihe waren 10 erfolgreiche Versuche vorgesehen, wobei mit einer Ausfallquote von 30 % geplant wurde.

#### **2. Herstellung vitaler Hirnschnitte**

In der vorliegenden Arbeit wurden sog. Akut-Schnittpräparate hergestellt. Um im Hirnschnitt die thalamokortikalen neuronalen Verbindungen zu erhalten, wurden die Schnittpräparate gewinkelt entsprechend der Publikation von Agmon und Connors angefertigt (Agmon & Connors, 1991).

##### **2.1. Präparation der Schnitte**

Die Versuchstiere wurden in eine Anästhesiekammer gesetzt und eine tiefe Narkose wurde nach klinischen Kriterien (Ausbleiben des Stellreflexes) durch tropfenweise Zugabe von Isofluran eingeleitet (Isofluran CP; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland). Anschließend erfolgte die Dekapitation mithilfe einer Guillotine (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer eisgekühlten mit Carbogengas

(95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) gesättigten artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) durchgeführt. Die aCSF dient als Puffermedium. Sie ist in ihrer Ionenzusammensetzung (Tab. 1) der eines physiologischen Liquors nachempfunden. Das Gehirn wurde mittels zweier Transversalschnitte von kaudal und einem flach geführten Sagittalschnitt entlang der Mittellinie des Schädels nach rostral freigelegt und nach Aufbiegen der Schädelhälften nach lateral und Durchtrennung der Nervi optici mit einem abgerundeten Spatel entnommen. Die Positionierung erfolgte mit der Basis nach unten und dem rostralen Ende auf einer 10 Grad Rampe abwärtsweisend. Die Schnittführung erfolgte vertikal im Winkel von 55 Grad zur sagittalen Mittellinie. Anschließend wurde das Präparat mit nach unten platzierter Schnittfläche auf einem Metallblock mit Histoakrylkleber befestigt. Die Herstellung 350 µm dicker Schnittpräparate erfolgte mittels eines Vibratoms (Microm HM 650V, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Anschließend wurden die Schnittpräparate in ein Inkubationsgefäß mit gesättigter aCSF überführt und 30 Minuten bei 35 Grad im Wasserbad inkubiert. Die Zusammensetzung der hierfür verwendeten aCSF unterschied sich zu der für die Präparation verwendeten aCSF. Sie ist in Tab. 2 dargestellt. Anschließend erfolgte eine weitere 30-minütige Aufbewahrung bei Raumtemperatur (20-24 Grad Celsius). Eine kontinuierliche Carbogengas-Zufuhr wurde während der Zeit im Inkubationsgefäß sichergestellt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der aCSF zur Präparation der Hirnschnitte**

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)
<b>NaCl</b>	58,44	125
<b>KCl</b>	74,55	2,5
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Monohydrat</b>	137,99	1,25
<b>D-(+)-Glucose-Monohydrat</b>	198,17	25
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	84,01	25
<b>MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat</b>	203,30	6
<b>CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat</b>	147,01	0,5

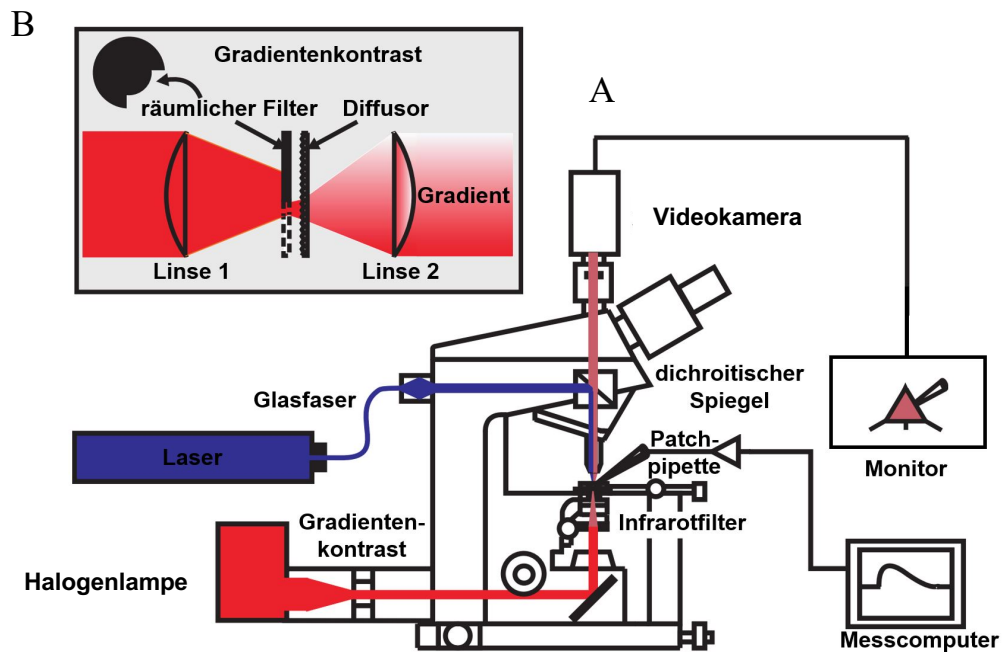
**Tabelle 2: Zusammensetzung der aCSF zur Durchführung der elektrophysiologischen Messungen**

<b>Substanz</b>	<b>Molekulargewicht (g/mol)</b>	<b>Konzentration (mM)</b>
<b>NaCl</b>	58,44	126
<b>KCl</b>	74,55	3
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Monohydrat</b>	137,99	1,25
<b>D-(+)-Glucose-Monohydrat</b>	198,17	10
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	84,01	26
<b>MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat</b>	203,30	2
<b>CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat</b>	147,01	2

## 2.2. Infrarotvideomikroskopie

Mittels der Infrarotvideomikroskopie (Dodt und Zieglgansberger, 1994) wurden die Neurone im vitalen Hirnschnittpräparat visualisiert. In der Standardmikroskopie sind einzelne Neuronen nicht darstellbar, da das Netzwerk aus einer großen Anzahl von dicht beieinander liegenden Neuronen besteht. Für die Infrarotmikroskopie wird Licht mit einer Wellenlänge von 780 nm zur Durchleuchtung des Hirngewebes verwendet, da langwelliges Licht Streustrahlung vermindert und einzelne Zellen besser dargestellt werden können. Zusätzlich wird zwischen Halogenlampe und Kondensor ein Interferenzfilter als Kontrastverstärker platziert.

Der zu untersuchende Bereich wurde im Durchlichtmikroskop (Axioscop FS, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einem 60fach vergrößerten Wasser-Immersionsobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus, Hamburg, Deutschland) mithilfe einer infrarotsensitiven Videokamera (Digital Camera C11440, ORCA-flash4.0LT, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) auf einem Monitor visualisiert. Das Infrarotmikroskop befindet sich zur elektrischen Abschirmung in einem Faradayschen Käfig und ist auf einem schwingungsgedämpften Messtisch positioniert.



**Abbildung 5: Versuchsaufbau des Infrarot-Videomikroskops und Gradientenkontrastmethode**

A: Schematischer Versuchsaufbau: Mithilfe der IR-Videomikroskopie können Neurone im akuten Hirnschnittpräparat visualisiert werden. Über eine Quarzfasern wird ein Laserimpuls in das Mikroskop geleitet und durch Vermittlung eines dichroitischen Spiegels und Objektivs auf das abgeleitete Neuron fokussiert. B: Prinzip des Gradientenkontrasts: Eine Viertel-feldbeleuchtung und nachgeschalteter Diffusor verringern das Streulicht, wodurch ein höherer Kontrast und Visualisierungstiefe erzeugt werden. Text & Abbildung verändert nach Dodt et al. 2002.

### 3. Elektrophysiologie

#### 3.1. Versuchsaufbau

Die Hirnschnitte wurden in eine mit aCSF perfundierte Ableitkammer gelegt. Das Auflegen eines sog. Grid, ein nylonbespannter Platindraht, verhinderte Bewegungen des Schnittes. Mithilfe motorisierter Mikromanipulatoren (SM7-Remote control system, Luigs & Neumann, Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland) war es möglich, das Mikroskop sowie die Messpipette unabhängig voneinander zu bewegen. Für die Messung von TK-Schaltneuronen und HCN-Kanälen galt folgender Versuchsaufbau: nach

Aufzeichnung stabiler Kontrollmessungen über 15 Minuten wurde die mit Carbogengas gesättigte aCSF in 3 unterschiedlichen Versuchsreihen mit einer Konzentration von 5, 10 und 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin versetzt und elektrophysiologische Messungen nach 20, 30 und 40 Minuten nach Applikation des S-Ketamins aufgezeichnet. Die Messreihen wurden in aufsteigender Konzentration durchgeführt. Für die anschließenden Messungen kortikaler sowie spontaner inhibitorischer postsynaptischer Ströme wurde nur eine Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **3.2. Whole-Cell-Konfiguration**

Im vorliegenden Promotionsprojekt wurde die erstmals von Neher und Sakmann beschriebene Patch Clamp Technik angewendet (Neher & Sakmann, 1976). Durch den hohen Abdichtungswiderstand zwischen Pipettenspitze und Zellmembran, welcher im Giga-Seal-Bereich liegt, bietet es im Gegensatz zur Methode mit Mikroelektroden den Vorteil auch kleinste Ströme zu messen. Alle Messungen der vorliegenden Untersuchungen erfolgten in der sog. „Whole-Cell“-Konfiguration (= Ganzzelleableitung), in der die gesamte elektrische Aktivität der Zelle dargestellt wird (Blanton et al. 1989).

#### **3.2.1. Anfertigung der Pipetten**

Mithilfe eines Horizontal-Pipettenziehgeräts (DMZ Universal Electrode Puller, Zeitz-Instruments Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland; Flaming/ Brown Micropipette Puller, Model P-1000, Sutter Instrument, USA) wurden die Borosilikat-Kapillaren (GB150EFT-10, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland; BF150-110-10, Sutter Instruments Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) angefertigt und hitzepoliert. Der Innendurchmesser betrug 1,17 mm bzw. 1,10 mm, der Außendurchmesser 1,5 mm. Die Messpipetten besaßen einen Spitzendurchmesser von 1  $\mu\text{m}$  und einen Gleichstromwiderstand von 3-7 M $\Omega$ . Der Widerstand wurde nach Eintauchen der Pipette in die aCSF bestimmt. Die in der Pipette befindliche Lösung wird als Intrazellulärlösung (IZ) bezeichnet. Ihre Zusammensetzung variierte je nach Versuchsaufbau, um optimale Bedingungen zur Ableitung bestimmter Ionenkanal-Klassen zu erreichen.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der „Standard-IZ“, pH= 7,25**

<b>Substanz</b>	<b>Molekulargewicht (g/mol)</b>	<b>Konzentration (mM)</b>
<b>K-Gluconate</b>	234,24	130
<b>NaCl</b>	58,44	5
<b>MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrate</b>	203,3	2
<b>HEPES</b>	238,3	10
<b>EGTA</b>	380,35	0,5
<b>ATP-K</b>	619,39	2
<b>GTP Na</b>	523,18	0,3

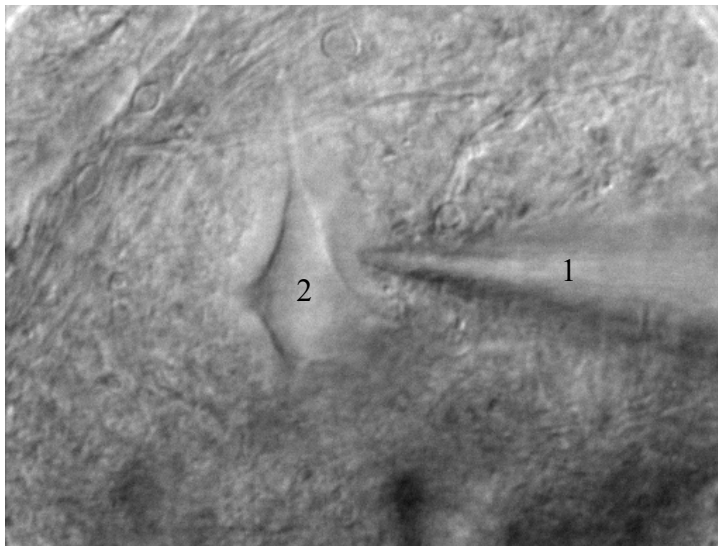
**Tabelle 4: Zusammensetzung der IZ zur Messung der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Ströme, pH= 7,2**

<b>Substanz</b>	<b>Molekulargewicht (g/mol)</b>	<b>Konzentration (mM)</b>
<b>KCl</b>	74,55	140
<b>NaCl</b>	58,44	5
<b>Phosphokreatin-di-tris</b>	255,08	20
<b>HEPES</b>	238,3	10
<b>EGTA</b>	380,35	0,1
<b>ATP-Mg</b>	507,18	2
<b>GTP Na</b>	523,18	0,3

### **3.2.2. Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration**

Die Ableitung der Neurone erfolgte in der Whole-Cell-Konfiguration im Voltage Clamp Modus des Messverstärkers. Die Messpipette war über einen chlorierten Silberdraht mit dem Verstärker (SEC-10L, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) verbunden. Das Anlegen eines Überdrucks erleichterte die visuelle Identifikation der Neurone durch eine Verbesserung der Sichtverhältnisse und Verhinderung einer Verschmutzung der Pipettenöffnung. Unter Sichtkontrolle erfolgte eine vorsichtige Annäherung der Pipette zum Zellsoma mit Verringerung

des Überdrucks bei Erreichen der Zellmembran. Anschließend wurden eventuell auftretende Offsetpotentiale korrigiert. Nach Berührung der Messpipette mit der Zellmembran wurde der restliche Überdruck abgelassen und unter Erzeugung eines stärker werdenden Unterdrucks die sog. „Cell-Attached“- Konfiguration hergestellt. Der sehr hohe Abdichtungswiderstand zwischen Pipettenrand und Zellmembran liegt im Gigaohm- Bereich ( $G\Omega$ ). Dieser wird als „Giga-Seal“ bezeichnet (Hamil et al., 1981). Der hohe Abdichtungswiderstand reduziert eventuell auftretendes Stromrauschen und ermöglicht die differenzierte Beobachtung einzelner Kanalaktivitäten (Hamill et al., 1981; Colquhoun et al., 1983; Sakman & Neher, 1983). Durch einen kurzen, stärkeren Sog wird der Bereich unter der Pipette, das sog. „Patch“ durchbrochen, wodurch die Whole-Cell- Konfiguration hergestellt wurde. Daraufhin war die Pipette leitend mit dem Zellinneren verbunden.



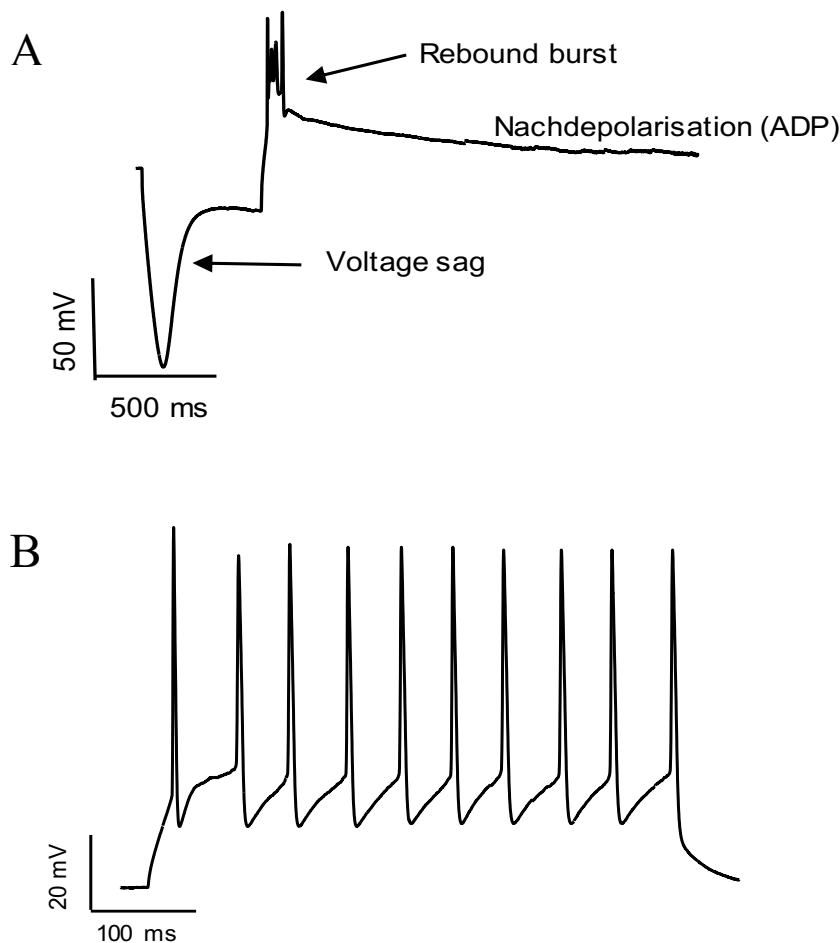
**Abbildung 6: Infrarotvideomikroskopiebild eines akuten Hirnschnittpräparates**

Annäherung der Patch-Pipette (1) zum thalamokortikalen Schaltneuron (2); eigene Abbildung



### 3.3. Identifizierung thalamokortikaler Schaltneurone

Die elektrophysiologische Identifizierung TK-Schaltneurone erfolgte im „Current-Clamp“ Modus. Durch Applikation eines Hyperpolarisationspulses mit einer Stärke von -350 pA und einer Dauer von 500 ms, wird der für TK-Schaltneurone charakteristische und durch HCN-Kanäle vermittelte „Voltage Sag“ ausgelöst (Ying et al., 2006), der sich durch einen langsamen, einwärtsgerichteten Kationenstrom  $I_h$  darstellt. Auf den „Voltage Sag“ folgt nach einer Repolarisation eine Salve von Aktionspotentialen, die als „Rebound Burst“ bezeichnet wird, gefolgt von einer anschließenden Nachdepolarisation (engl.: afterdepolarisation, ADP) (Ying & Goldstein, 2005). Die unterschiedlichen Aktivitätszustände werden durch einen depolarisierten Strompuls, abhängig von ihrem Membranpotential ausgelöst.



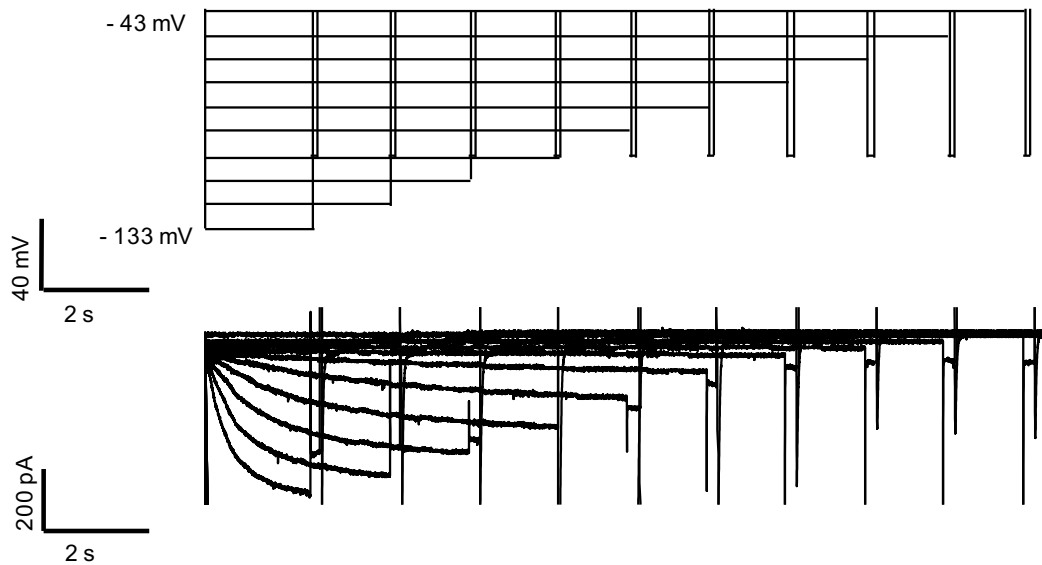
**Abbildung 7: Typische elektrophysiologische Eigenschaften thalamokortikaler Schaltneurone**

A: Charakteristischer Antwortverhalten eines TK-Schaltneurons auf die Applikation eines Hyperpolarisationspulses ist der depolarisierende Einwärtsstrom, „Voltage Sag“ der darauffolgende „Rebound Burst“ sowie die Nachdepolarisation. B: Tonisches Aktivitätsmuster mit Generierung einzelner Aktionspotentiale als Reaktion auf depolarisierten Stimpuls von depolarisierten Neuronen (Membranpotential bei -50 mV).

### 3.4. Messungen an HCN-Kanälen

Alle Messungen zur Ermittlung des durch den HCN-Kanal vermittelten  $I_h$  Stroms erfolgten im Voltage-Clamp Modus. Durch eine stufenweise Hyperpolarisation ( $\Delta$  mV = 10) von -43 mV bis zu maximal -133 mV wurde der Kationenstrom  $I_h$  aktiviert. Die Pulslänge wurde mit steigender Hyperpolarisation um 500 ms verkürzt, um die Stabilität der Ableitung zu gewährleisten, ohne die Aktivierungskinetik zu beeinflussen. Nach jedem Spannungsschritt wurde die Zelle auf -103 mV geklemmt. Dieser Spannungssprung spiegelt den  $I_{tail}$  wieder.

Anhand ihrer Amplituden lässt sich der Anteil der geöffneten Kanäle und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bestimmen. Mithilfe der Spannungsabhängigkeit der „Tail-Ströme“ ermittelt man durch eine Normalisierung die Offenwahrscheinlichkeit (pV) der HCN Kanäle bei jeweils festgesetzter Membranspannung (Pape et al., 2005; Budde et al., 2008). Alle Messungen zur Ermittlung von  $I_h$  Strömen wurden durch Zugabe von 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ba}^{2+}$  zur Extrazellulärlösung durchgeführt, um den einwärtsgerichteten Kationenstrom  $K_{ir}$  zu inhibieren und  $I_h$  Ströme zu isolieren (Budde et al., 2008).

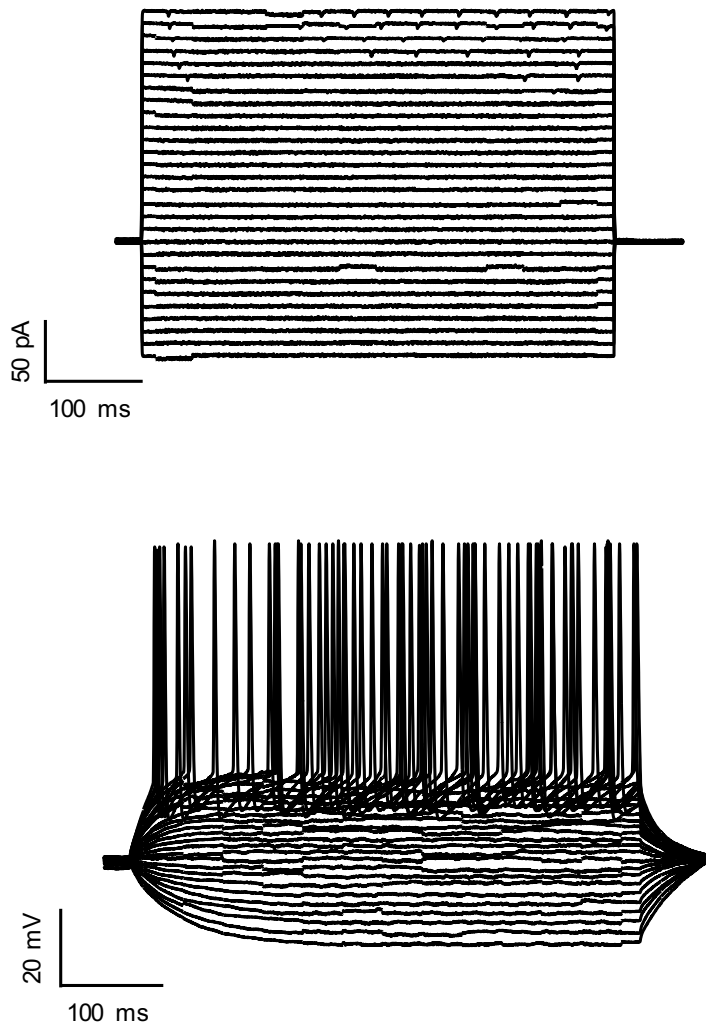


**Abbildung 8: Spannungsprotokoll  $I_h$**

$I_h$  wurde durch Spannungssprünge von -43 mV in hyperpolarisierender Richtung bis -133 mV aktiviert. Durch die zunehmende Aktivierungskinetik wurde die Pulslänge um 500 ms mit zunehmender Hyperpolarisation verkürzt, um die Stabilität der Whole-Cell-Konfiguration zu verbessern. Nach jedem Spannungsschritt wurde die Zelle auf -133 mV geklemmt. Ableitung im Voltage-Clamp-Modus unter Zugabe von  $150 \mu\text{M Ba}^{2+}$

### 3.5. Strom-Spannungsbeziehung und Membraneigenschaften

Im Current-Clamp Modus wurden zur Ermittlung des Membranpotentials Strompulse mit einer Pulslänge von 500 ms im Abstand von 2 s appliziert. Die Stromstärke wurde schrittweise um jeweils +10 pA von -90 pA bis max. +360 pA erhöht. Anhand der Veränderung des Membranpotentials lassen sich das Ruhemembranpotential, der Membranwiderstand  $R_M$  sowie die Auslöseschwelle von Aktionspotentialen wie auch deren Frequenz ableiten.



**Abbildung 9: Strom-Spannungsbeziehungen (IV)**

Injektion von 28 stufenförmigen Stromimpulsen mit einer Pulslänge von 500 ms. Ausgehend von -90 pA wurde die Zellmembran der abgeleiteten Zelle in Intervallen von 10 pA bis +360 pA zunehmend depolarisiert. Aus den Spannungsantworten ließen sich die aktiven und passiven Membraneigenschaften berechnen. Ableitung im Current-Clamp- Modus unter Zugabe von 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ba}^{2+}$ .

### 3.6. GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte spontane postsynaptische Ströme

Die Messung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelten spontanen postsynaptischen Strömen wurde im Voltage-Clamp Modus durchgeführt. Die in der Lamina IV abgeleitete Zelle wurde konstant auf ein Membranpotential von -70 mV geklemmt. Außerdem wurde die Zusammensetzung der IZ angepasst (s. oben). Zur Beurteilung der Wirkung von S-Ketamin auf die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Inhibition wurden sog. spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSC) gemessen. Dabei handelt es sich um rezeptorvermittelte Ionenströme an

der postsynaptischen Zelle, die durch spontane Transmittermitterfreisetzung hervorgerufen werden.

Um GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Ströme isoliert darzustellen, wurde der Extrazellulärlösung der spezifische GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonist CGP 55845 (5  $\mu$ M) sowie der AMPA-Rezeptor-Antagonist NBQX (5  $\mu$ M) hinzugefügt.

#### **4. Auswertung und Statistik**

Die Stromantworten wurden mit HEKA Pulse (HEKA Pulse, Heka Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) aufgenommen. Zur Aufzeichnung stabiler Messungen wurden zunächst vitale von toten Zellen differenziert. Tote Zellen haben einen runden Zellkörper, wirken geschwollen und ihr Nukleus ist oft schon sichtbar. Vitale Zellen liegen oft in tieferen Schichten der Schnitte und besitzen eine klare, gut sichtbare Zellmembran. In die Auswertung flossen nur Zellen mit ein, die mindestens ein RMP von -55 mV besaßen und über die gesamte Dauer der Baselinemessungen stabile Antworten erzeugten. Neurone, die während oder nach der ersten Messung nach Applikation mit S-Ketamin stark schwankende Antworten erzeugten, oder ein deutlich schlechtes RMP zeigten, wurden exkludiert. Ein weiteres Einschlusskriterium der Zellen war das Erreichen einer stabilen Verbindung mit hohem Abdichtungswiderstand im Bereich des Giga-Seals. Nur durch Erreichen eines Giga-Seals werden stabile Messungen mit aussagekräftigen Ergebnissen erzeugt.

Die Gruppengröße richtete sich nach den Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe, die vorher zu signifikanten Ergebnissen geführt hatten (Kratzer et al., 2017).

Die Erfassung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel, die anschließende Auswertung mit der Software Igor Pro 5 (Wave Metrics, Lake Oswego, USA). Graph Pad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc, USA) wurde zur Veranschaulichung der Daten und Erstellung der Graphiken verwendet. Die Ergebnisse wurden mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf statistische Signifikanz überprüft. Dabei wurde  $p < 0,05$  als statistisch signifikant festgesetzt. Die Ergebnisse werden als Median mit 95 % Konfidenzintervall (95%-KI) dargestellt.



## **IV. ERGEBNISSE**

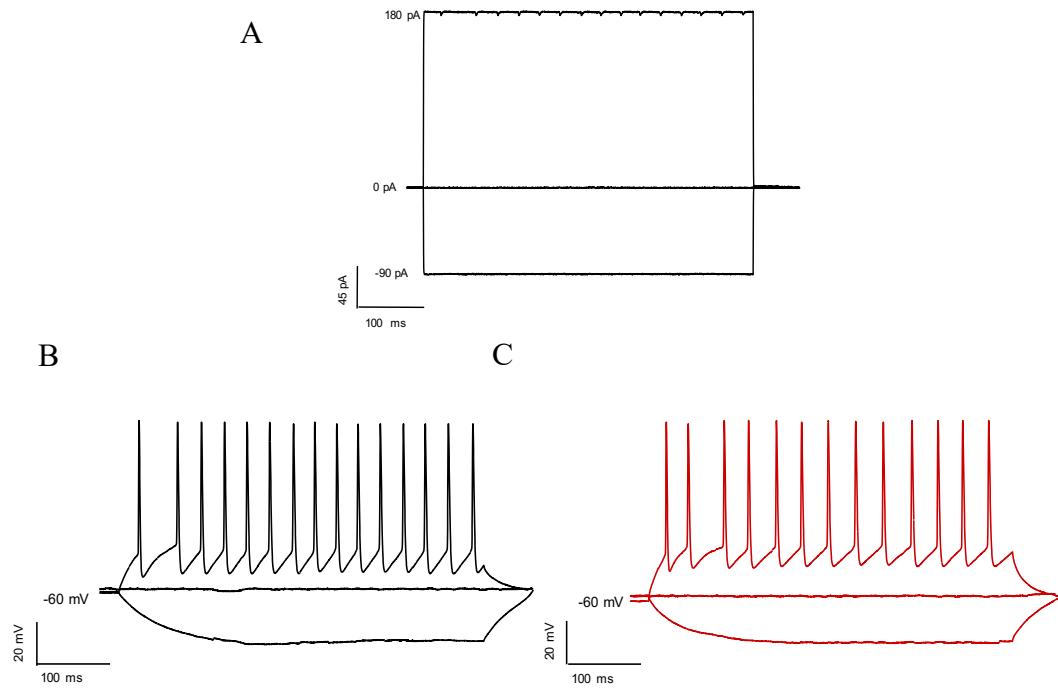
In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Anästhetikums S-Ketamin auf die Erregbarkeit thalamokortikaler sowie kortikaler Neurone untersucht.

### **1. Einfluss von S-Ketamin auf die intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen**

Unter dem Einfluss von Ketamin ist eine gesteigerte Aktivität im EEG zu beobachten. Dies ist ein weiteres Alleinstellungsmerkmal von Ketamin, da es unter allen anderen Anästhetika zu einer verminderten kortikalen Aktivität kommt. Dieses Phänomen könnte aus einer erhöhten thalamischen neuronalen Aktivität resultieren, weswegen zunächst die Wirkung von S-Ketamin auf die intrinsische Erregbarkeit TK-Schaltneurone in 3 unterschiedlichen Konzentrationsreihen, zu 3 verschiedenen Messzeitpunkten, mithilfe der Patch-Clamp Technik in der Whole-Cell-Konfiguration untersucht wurde. Aktive und passive Membraneigenschaften ließen sich anhand der Strom-Spannungsbeziehungen ermitteln. Als Parameter der intrinsischen Erregbarkeit wurde das Ruhemembranpotential, der Membranwiderstand in Abhängigkeit der Strominjektion, der Schwellenwert, bei dem das erste Aktionspotential (AP) ausgelöst wird, sowie die Frequenz der hervorgerufenen Aktionspotentiale herangezogen.

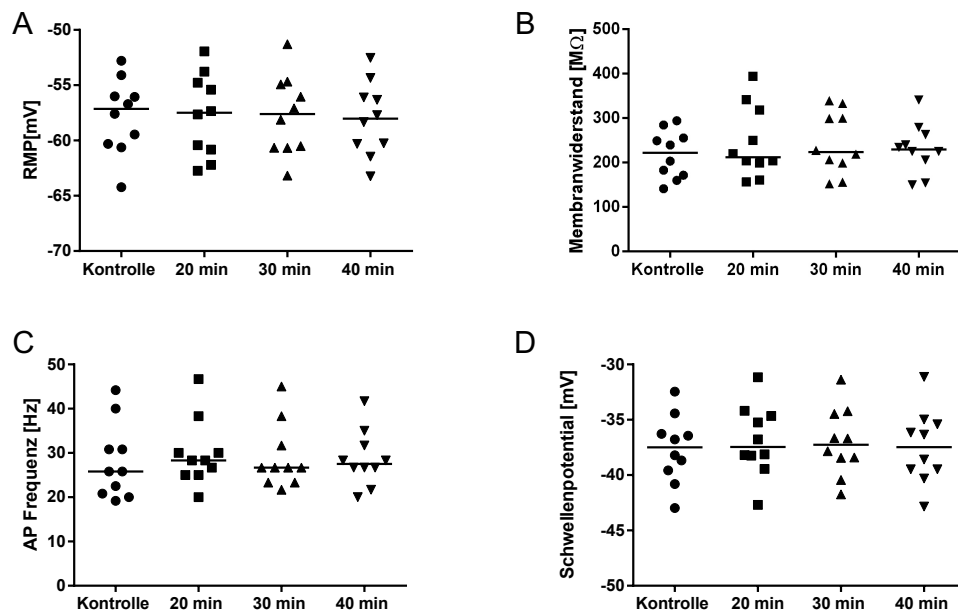
Unter keiner der getesteten Konzentrationen konnte eine erhöhte Erregbarkeit TK-Schaltneurone nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind für die einzelnen Konzentrationsstufen in Abb. 11-13 dargestellt. Die Daten werden als Median mit dem korrespondierenden 95% Konfidenzintervall angegeben.





**Abbildung 10: Repräsentative Spannungskurven zur Berechnung der aktiven und passiven Membraneigenschaften**

A: Spannungsprotokoll bei Applikation von -90 pA; 0 pA und 180 pA; B: Repräsentative Spannungsantwort (Kontrolle): bei -90 pA Berechnung des Membranwiderstandes; bei 0 pA (keine Stromapplikation) Berechnung des RMP; bei 180 pA Berechnung der AP-Frequenz. C: Repräsentative Spannungsantwort unter 5  $\mu$ M S-Ketamin nach 20 min



**Abbildung 11: Membranbiophysiological Eigenschaften TK-Schaltneurone unter 5 µM S-Ketamin.**

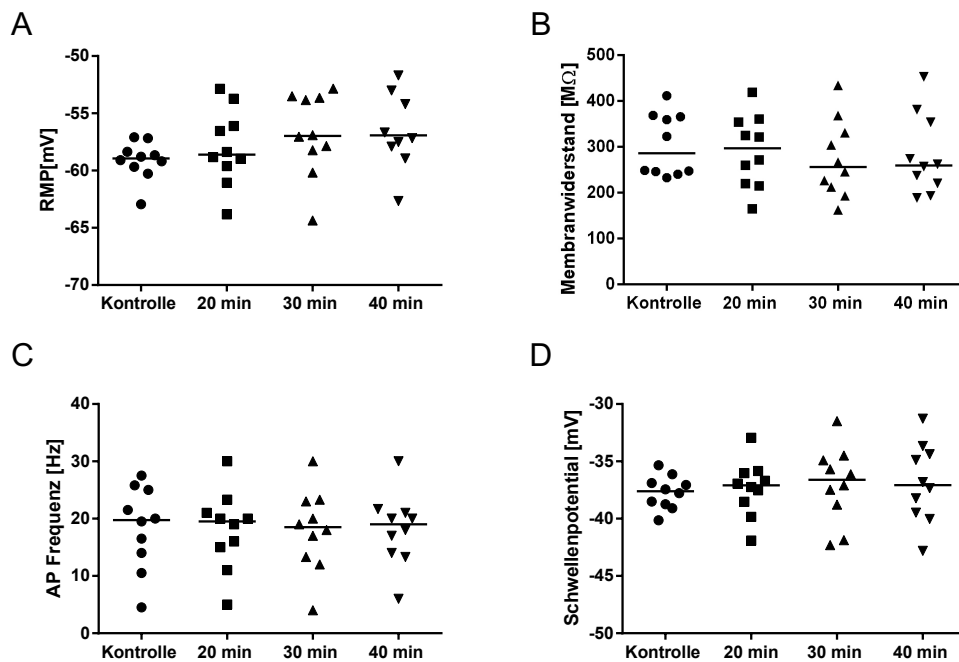
S-Ketamin zeigte zu keinem der drei Messzeitpunkte einen signifikanten Einfluss auf die aktiven oder passiven Membraneigenschaften TK-Schaltneurone. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n = 10$  für alle Messwerte

A: S-Ketamin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Ruhemembranpotential. (Kontrolle: -57,15 [-60,23; -55,35] mV; 20 min: -57,49 [-60,38; -55,03] mV,  $p = 0,7695$ ; 30 min: -57,61 [-60,29; -55,15] mV,  $p = 0,6953$ ; 40 min: -58,03 [-60,44; -55,68] mV,  $p = 0,8457$ )

B: Der Membranwiderstand verändert sich nicht signifikant. (Kontrolle: 221,7, [180,0; 256,9] MΩ; 20 min: 212,3 [187,6; 302,5] MΩ,  $p = 0,1055$ ; 30 min: 223,5 [193,4; 293,0] MΩ,  $p = 0,0879$ ; 40 min: 229,9 [191,4; 272,3] MΩ,  $p = 0,375$ )

C: Die Frequenz der Aktionspotentiale zeigte keine signifikanten Veränderungen. (Kontrolle 25,83, [21,90; 34,10] Hz; 20 min: 28,33 [24,43; 35,24] Hz,  $p = 0,2734$ ; 30 min: 26,67 [23,72; 34,28] Hz,  $p = 0,4453$ ; 40 min: 27,50 [24,18; 33,16] Hz,  $p = 0,7480$ )

D: Das Schwellenpotentials war unter S-Ketamin nicht signifikant verändert. (Kontrolle: -37,49 [-39,86; -35,46] mV; 20 min: -37,34 [-39,17; -34,57] mV,  $p = 0,0742$ ; 30 min: -37,27 [-39,23; -34,83] mV,  $p = 0,2754$ ; 40 min: -37,47 [-39,85; -35,08] mV,  $p = 0,625$ )



**Abbildung 12: Membranbiophysiological Eigenschaften TK-Schaltneurone unter 10 µM S-Ketamin**

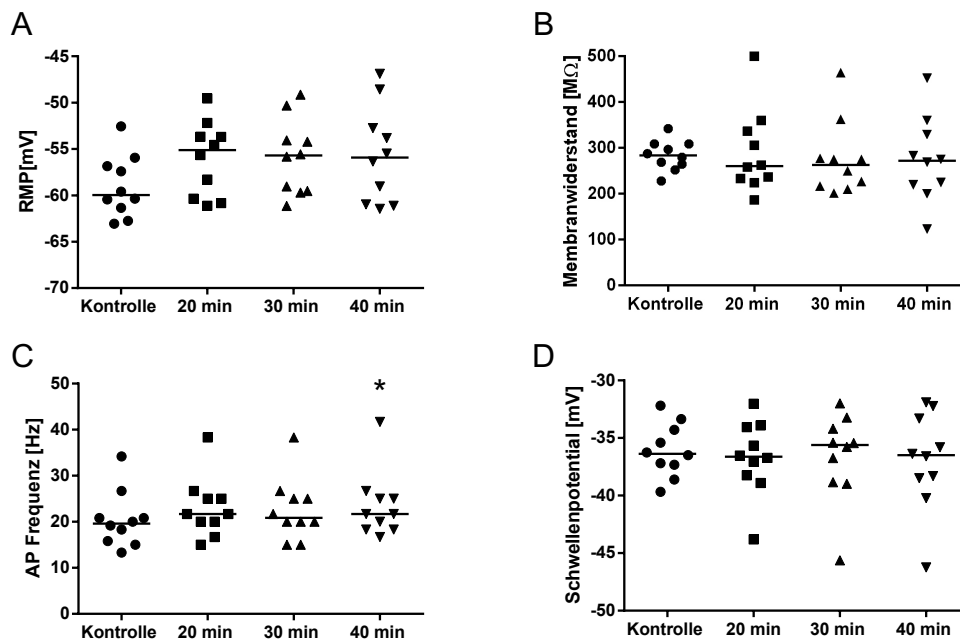
Auch unter einer Erhöhung der Ketamin-Konzentration konnte kein signifikanter Effekt auf die Erregbarkeit TK-Schaltneurone gezeigt werden. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n = 10$  für alle Messwerte

A: Das Ruhemembranpotential wurde zu keinem Messzeitpunkt signifikant beeinflusst (Kontrolle:  $-58,94 [60,32; -57,93]$  mV, 20 min:  $-58,60 [-60,35; -55,63]$  mV,  $p = 0,3223$ ; 30 min:  $-56,98 [-59,42; -54,26]$  mV,  $p = 0,0645$ ; 40 min:  $-56,93 [-59,18; -51,16]$  mV,  $p = 0,0645$ )

B: Der Membranwiderstand veränderte sich nicht signifikant. (Kontrolle:  $286,1 [255,9; 353,3]$  MΩ; 20 min:  $296,7 [235,3; 347,4]$  MΩ,  $p = > 0,999$ ; 30 min:  $256,6 [214,0; 335,2]$  MΩ,  $p = 0,625$ ; 40 min:  $259,8 [220,4; 344,3]$  MΩ,  $p = 0,8457$ )

C: Die Frequenz wurde nicht signifikant verändert (Kontrolle:  $19,75 [13,29; 23,67]$  Hz; 20 min:  $19,50 [13,14; 22,93]$  Hz,  $p = 0,7656$ ; 30 min:  $18,50 [12,87; 23,07]$  Hz,  $p = 0,6133$ ; 40 min:  $19,00 [13,59; 22,61]$  Hz,  $p = 0,775$ )

D: Das Schwellenpotential veränderte sich nicht signifikant. (Kontrolle:  $-37,61 [38,75; -36,68]$  mV; 20 min:  $-37,09 [-39,08; -35,62]$  mV,  $p = 0,5566$ ; 30 min:  $-36,61 [-39,39; -34,66]$  mV,  $p = 0,4316$ ; 40 min:  $-37,08 [-39,34; -34,43]$  mV,  $p = 0,3750$ )



**Abbildung 13: Membranbiophysiological Eigenschaften TK-Schaltneurone unter 30  $\mu$ M S-Ketamin**

Lediglich die Frequenz der evozierten Aktionspotentiale unter 30  $\mu$ M war nach 40 min signifikant erhöht. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n=10$  für alle Messwerte

A: S-Ketamin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Ruhemembranpotential. (Kontrolle: -59,97 [-61,39; -56,66] mV; 20 min: -55,11 [-58,84; -53,14],  $p=0,0840$ ; 30 min: -55,69 [-58,76; -52,95] mV,  $p=0,084$ ; 40 min: -55,92 [-59,36; -51,93] mV,  $p=0,1934$ )

B: Der Membranwiderstand verändert sich nicht signifikant. (Kontrolle: 283,9 [260,6; 307,2] M $\Omega$ ; 20 min: 260,3 [225,3; 355,3] M $\Omega$ ,  $p=0,4922$ ; 30 min: 262,5 [217,9; 334,1] M $\Omega$ ,  $p=0,4922$ ; 40 min: 271,9 [208,0; 339,5] M $\Omega$ ,  $p=0,375$ )

C: Die Frequenz der Aktionspotentiale war nach 40 Minuten signifikant verändert. (Kontrolle: 19,58 [16,05; 24,78] Hz; 20 min: 21,67 [18,34; 27,66] Hz,  $p=0,0742$ ; 30 min: 20,83 [17,83; 27,51] Hz,  $p=0,1094$ ; 40 min: 21,67 [18,37; 28,63] Hz,  **$p=0,0352$** )

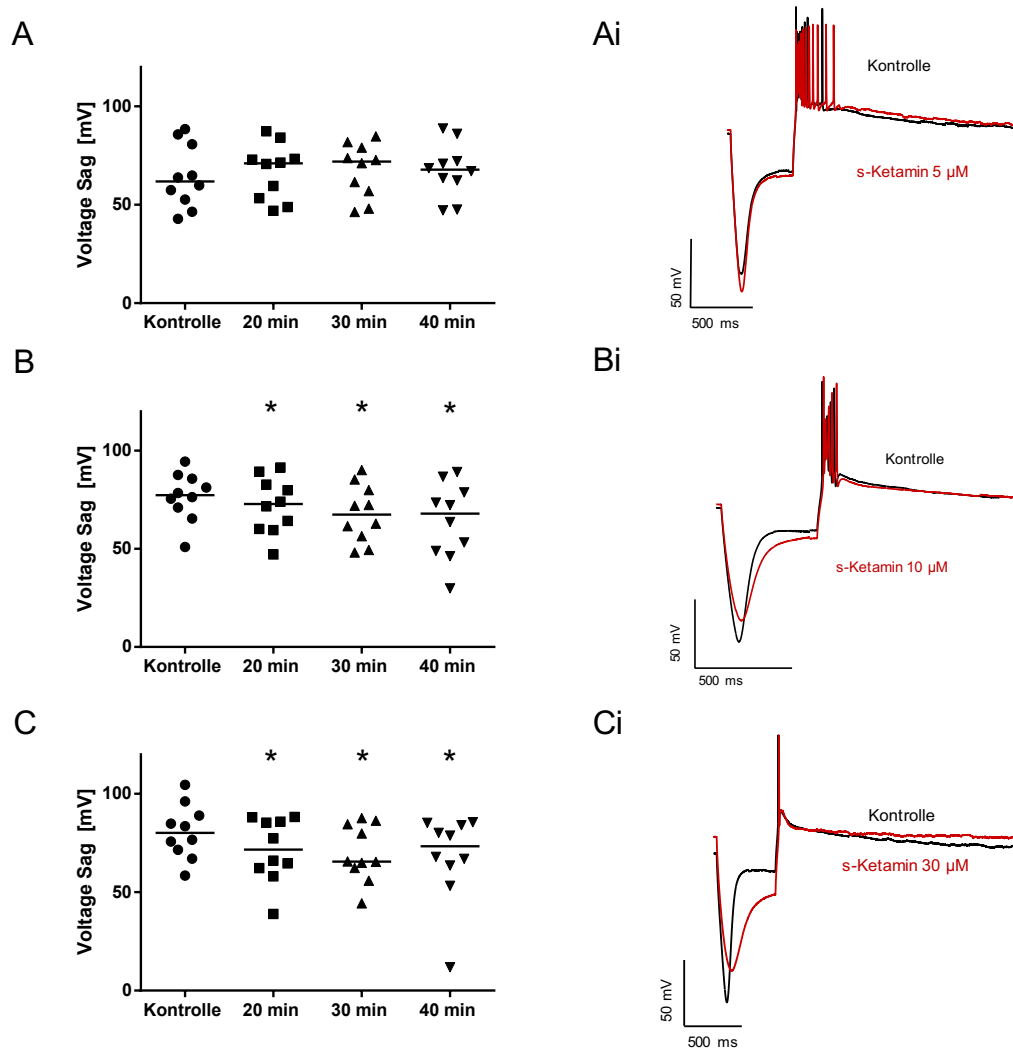
D: Das Schwellenpotential veränderte sich nicht signifikant. (Kontrolle: -36,08 [-37,74; -34,42] mV; 20 min: -36,63 [-39,03; -34,36] mV,  $p=0,5566$ ; 30 min: -36,62 [-39,38; -33,86] mV,  $p>0,999$ ; 40 min: -36,95 [-40,0; -33,89] mV,  $p=0,5742$ )

## **2. Wirkung von S-Ketamin auf HCN-Kanäle**

HCN-Kanäle tragen signifikant zur Erregbarkeit und Stabilisierung des Membranpotentials bei. In dieser Messreihe wurde daher der Einfluss von S-Ketamin auf HCN-Kanäle in TK-Schaltneuronen untersucht. Die Messungen wurden in der Whole-Cell-Konfiguration sowohl im Current-Clamp- als auch im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt.

### **2.1. Wirkung von S-Ketamin auf den HCN-Kanal vermittelten Voltage Sag**

Durch die Applikation eines hyperpolarisierenden Strompulses mit einer Stärke von 350 pA, wird der durch HCN Kanäle vermittelte „Voltage Sag“ ausgelöst. Dieser stellt eine transiente Depolarisation des Membranpotentials dar. Die Whole-Cell-Ableitungen wurden im Current-Clamp Modus mit Zugabe von  $\text{Ba}^{2+}$  durchgeführt, um einwärts-gleichrichtende Kalium-Kanäle zu inhibieren (Meuth et al., 2003). Unter der Zugabe von S-Ketamin in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  konnte keine signifikante Veränderung des durch HCN-Kanäle hervorgerufenen  $I_h$  beobachtet werden. Unter 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin kam es zu jedem Messzeitpunkt zu einer signifikanten Verminderung des Voltage Sags (Abb. 14).



**Abbildung 14: Die Wirkung von S-Ketamin auf den durch HCN-Kanäle vermittelten Voltage Sag**

**Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n=10$  für alle Messwerte**

**A:** Unter 5 µM S-Ketamin konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung festgestellt werden. (Kontrolle: 61,68 [52,86; 75,70] mV; 20 min: 71,08 [56,77; 76,95] mV,  $p=0,3223$ ; 30 min: 71,95 [57,82; 77,43] mV,  $p=0,1934$ ; 40 min: 67,80 [57,63; 77,19] mV,  $p=0,1602$ )

**B:** Eine Dosiserhöhung auf 10 µM S-Ketamin bewirkte eine signifikante Verminderung des Voltage Sags. (Kontrolle: 77,39 [67,88; 85,50] mV; 20 min: 72,84 [61,81; 82,23] mV,  $p=0,0195$ ; 30 min: 67,41 [57,39; 78,23] mV,  $p=0,0273$ ; 40 min: 67,96 [50,43; 78,05] mV,  $p=0,0039$ )

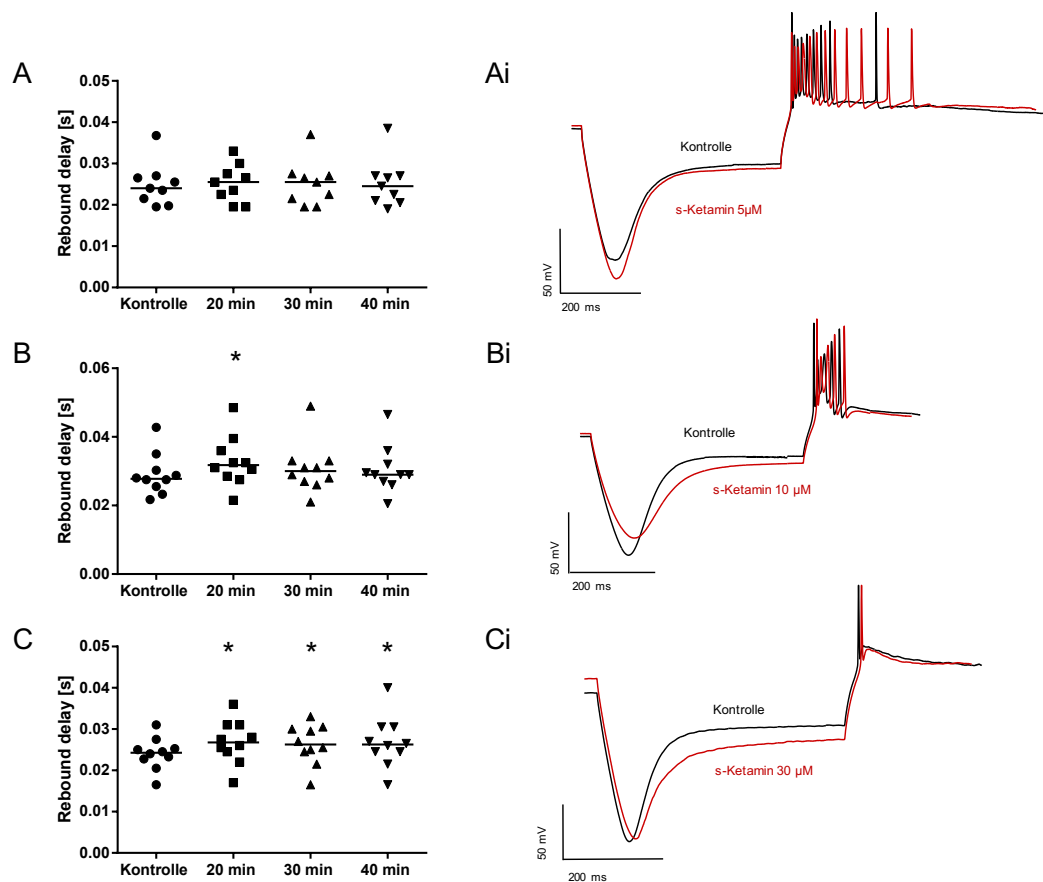
**C:** Auch unter 30 µM S-Ketamin wurde der Voltage Sag signifikant vermindert. (Kontrolle: 80,10 [70,92 – 90,62] mV; 20 min: 71,67 [59,80; 83,13] mV,  $p=0,0371$ ; 30 min: 65,50 [59,38; 80,0] mV,  $p=0,0273$ ; 40 min: 73,38 [51,73; 83,76] mV,  $p=0,0273$ )

Ai-Ci: Repräsentative Spannungsantworten eines TK-Schaltneurons für ein Experiment unter Kontrollbedingungen sowie unter 5, 10 und 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin nach 20 min. Zu erkennen ist eine Abnahme des Voltage Sags unter 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin

## **2.2. Die Wirkung von S-Ketamin auf den Rebound Burst Delay**

Auf den Voltage Sag folgt nach einer Repolarisation eine Salve von Aktionspotentialen, der sog. Rebound Burst. Die Zeit vom Start der Repolarisation bis zur Spitze des ersten Aktionspotentials wird als Rebound Burst Delay bezeichnet. Der Rebound Burst Delay spiegelt die Erregbarkeit TK-Schaltneurone wieder. S-Ketamin in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  führte zu keiner signifikanten Veränderung des Rebound Burst Delays. Unter einer erhöhten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  S-Ketamin war der Rebound Delay nach 20 min signifikant verlängert. Eine Dosiserhöhung auf 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin führte zu einer konstanten signifikanten Verlängerung des Rebound Burst Delays zu allen drei Messzeitpunkten (Abb. 15).





**Abbildung 15: Die Wirkung von S-Ketamin auf den Rebound Burst Delay**

**Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n = 10$  für alle Messwerte**

A: 5 µM S-Ketamin zeigte keine signifikante Veränderung auf den Rebound Burst Delay (Kontrolle: 0,024 [0,02088; 0,02890] s; 20 min: 0,0255 [0,02178; 0,02878] s,  $p = 0,5781$ ; 30 min: 0,0255 [0,02100; 0,02934] s,  $p = 0,3438$ ; 40 min: 0,0245 [0,02069; 0,02964] s,  $p = 0,6055$ )

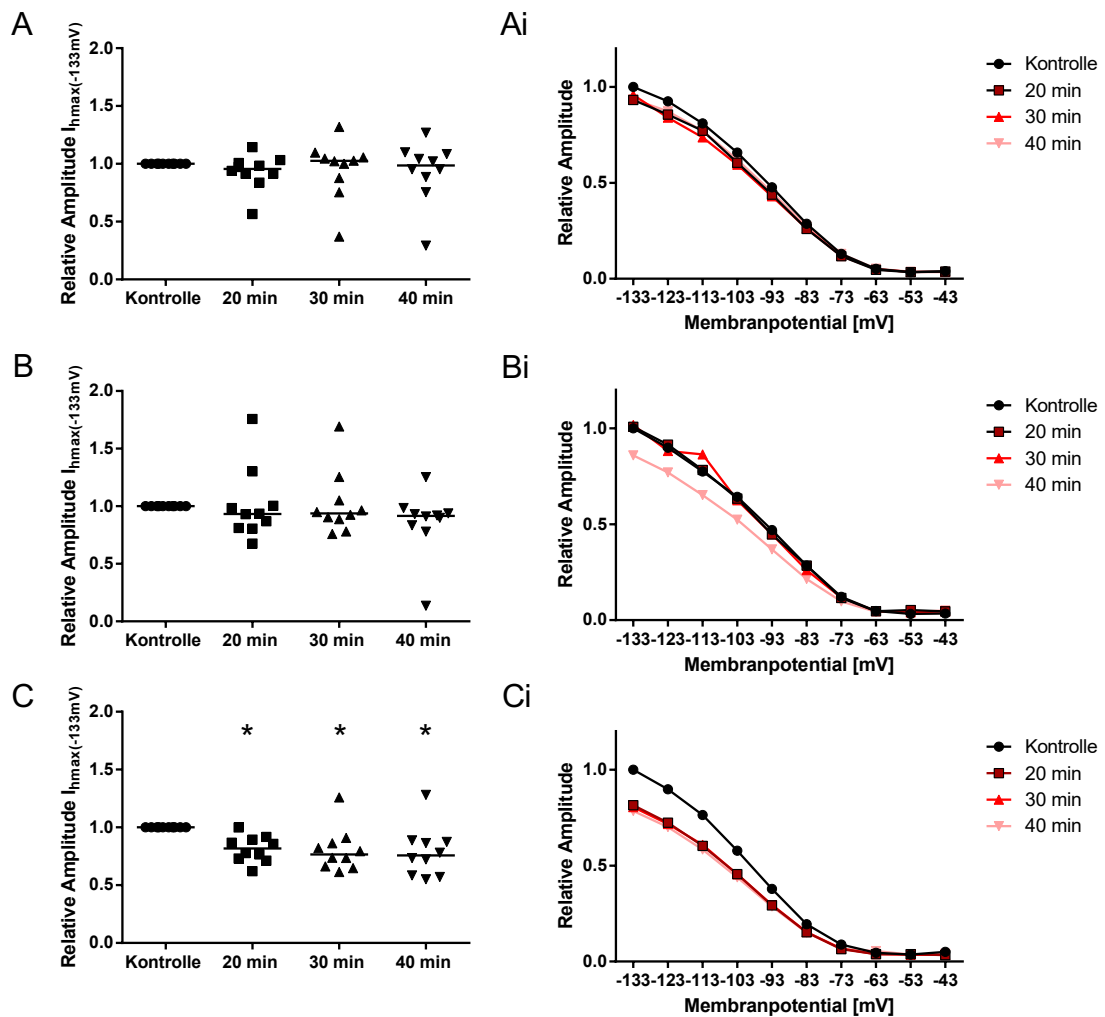
B: Eine Dosiserhöhung auf 10 µM S-Ketamin bewirkte eine signifikante Verlängerung des Rebound Burst Delay bei 20 min. (Kontrolle: 0,02775 [0,02469; 0,03336] s; 20 min: 0,03175 [0,02755; 0,03805] s,  $p = 0,0078$ ; 30 min: 0,0300 [0,02555; 0,03605] s,  $p = 0,1641$ ; 40 min: 0,0290 [0,02551; 0,03539] s,  $p = 0,3594$ )

C: Bei 30 µM S-Ketamin war der Rebound Burst Delay zu allen Messzeitpunkten verlängert. (Kontrolle: 0,02425 [0,02126; 0,02679] s ; 20 min: 0,02675 [0,02309; 0,03061] s,  $p = 0,0020$ ; 30 min: 0,02625 [0,02283; 0,02977] s,  $p = 0,0039$ ; 40 min: 0,02625 [0,0223; 0,03119] s,  $p = 0,0039$ )

Ai- Ci: Repräsentative Spannungskurven unter Kontrollbedingungen sowie unter 5, 10 und 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin nach 20 min. Zu erkennen ist, dass es unter 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin zu einer Verlängerung des Rebound Burst Delays kam.

### **2.3. Wirkung auf den HCN-Kanal vermittelten Kationenkanal $I_h$**

Zur Beurteilung des Kationenstroms  $I_h$  wurde das abgeleitete Neuron im Voltage-Clamp-Modus stufenweise um -10 pA von -43 mV auf -133 mV hyperpolarisiert. Durch eine starke Hyperpolarisation der Zelle (-133 mV), lässt sich die maximale  $I_h$  Amplitude bestimmen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Messdaten auf die maximale  $I_h$  Amplitude unter Kontrollbedingungen mit 1,0 normalisiert. Nach Applikation von S-Ketamin in einer Konzentration von 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M kam es zu keiner signifikanten Abnahme des  $I_h$  Stroms, hingegen war bei einer erhöhten Konzentration von 30  $\mu$ M eine signifikante Abnahme der relativen Amplitude von  $I_h$  zu beobachten (Abb. 16).



**Abbildung 16: Die Wirkung von S-Ketamin auf den HCN-Kanal vermittelten Kationenstrom  $I_h$**

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n = 10$  für alle Messwerte

A: Unter 5  $\mu M$  S-Ketamin konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden. (Kontrolle: 1 [1; 1]; 20 min: 0,9561 [0,8222; 1,040],  $p = 0,1602$ ; 30 min: 1,025 [0,7769; 1,137],  $p = > 0,9999$ ; 40 min: 0,9865 [0,7462; 1,124],  $p = 0,6953$ )

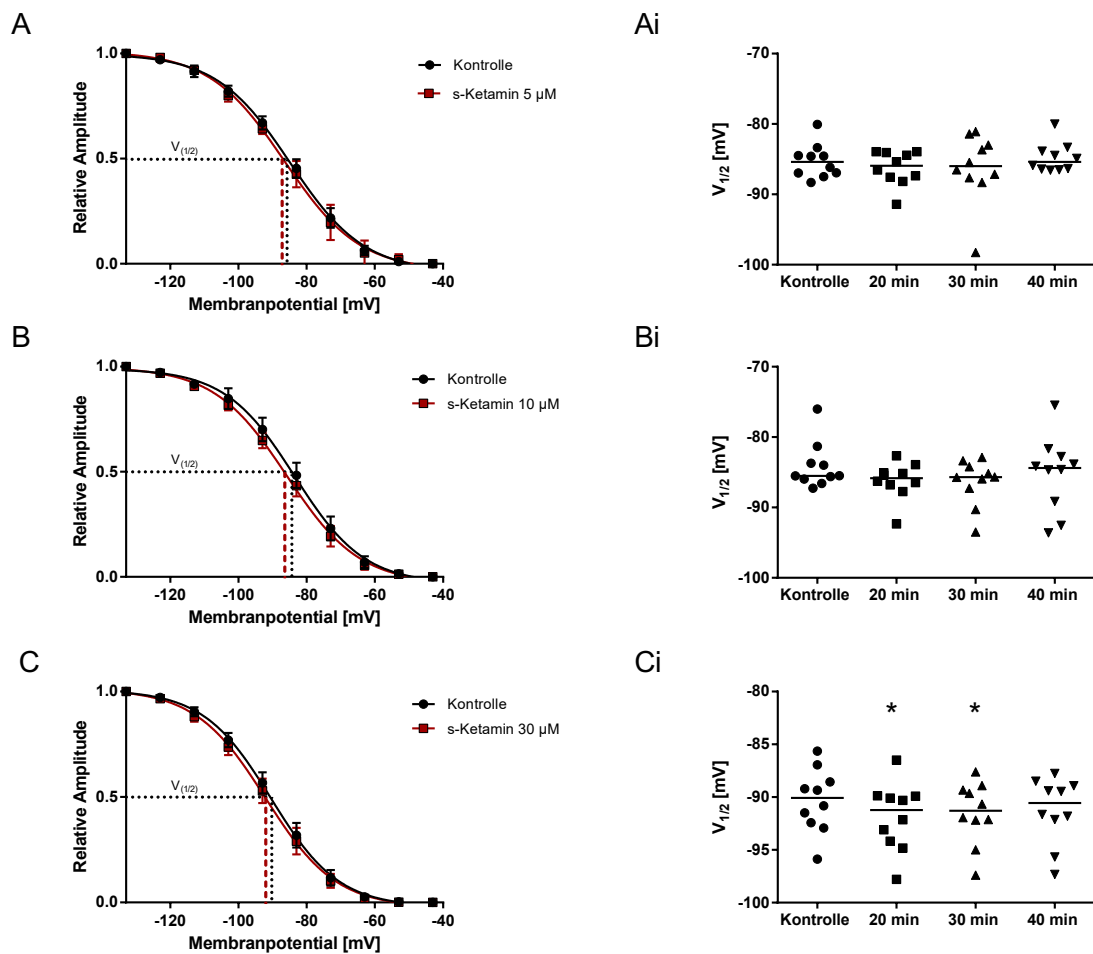
B: Auch eine Dosiserhöhung auf 10  $\mu M$  S-Ketamin hatte keinen signifikanten Einfluss. (Kontrolle: 1 [1; 1]; 20 min: 0,9332 [0,7853; 1,230],  $p = 0,4316$ ; 30 min: 0,9370 [0,8202; 1,214],  $p = 0,5566$ ; 40 min: 0,9153 [0,6558; 1,060],  $p = 0,0645$ )

C: 30  $\mu M$  S-Ketamin führte zu einer signifikanten Reduktion der  $I_{hmax}(-133mV)$  (Kontrolle: 1,0 [1; 1]; 20 min: 0,8173 [0,7335; 0,8947],  $p = 0,0020$ ; 30 min: 0,7656 [0,6712; 0,9373],  $p = 0,0195$ ; 40 min: 0,7573 [0,6308; 0,9391],  $p = 0,0371$ )

Ai- Ci: Relative Amplitude von  $I_h$  in Abhängigkeit des Membranpotentials unter 5  $\mu M$ , 10  $\mu M$  und 30  $\mu M$  S-Ketamin.

#### **2.4. Die Wirkung von S-Ketamin auf die Aktivierungskinetik $p(V)$ und die halbmaximale Aktivierung ( $V_{1/2}$ )**

Basierend auf der Annahme, dass bei einem Membranpotential von -133 mV alle HCN-Kanäle geöffnet sind, lässt sich der Wert ( $V_{1/2}$ ) ermitteln, der das Membranpotential widerspiegelt, bei dem 50 % der HCN-Kanäle geöffnet sind. Für S-Ketamin (5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M) konnte kein signifikanter Effekt auf  $V_{1/2}$  beobachtet werden. Jedoch bewirkte 30  $\mu$ M S-Ketamin nach 20 und 30 min eine signifikante Verschiebung von ( $V_{1/2}$ ) in hyperpolarisierende Bereiche (Abb. 17).



**Abbildung 17: Die Wirkung von S-Ketamin auf das Potential der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ )**

**Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n=10$  für alle Messwerte**

A-C: Abgebildet ist der Einfluss von S-Ketamin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die spannungsabhängige fraktionelle Aktivierung von  $I_h$  im Vergleich zu Messungen unter Kontrollbedingungen.  $V_{1/2}$  mit gestrichelter Linie markiert

Ai: Unter 5  $\mu\text{M}$  S-Ketamin konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden. (Kontrolle: -85,38 [-87,03; -83,55] mV; 20 min: -85,95 [-88,01; -84,54] mV,  $p=0,375$ ; 30 min: -85,99 [-89,78; -82,72] mV,  $p=0,7344$ ; 40 min: -85,39 [-86,30; -83,35] mV,  $p=0,2754$ )

Bi: Auch Eine Dosiserhöhung auf 10  $\mu\text{M}$  S-Ketamin hatte keinen signifikanten Einfluss. (Kontrolle: -85,51 [-86,52; -81,77] mV; 20 min: -85,69 [-88,72; -84,08] mV,  $p=0,1602$ ; 30 min: -84,38 [-89,07; -81,42] mV,  $p>0,999$ ; 40 min: -85,84 [-88,05; -84,32] mV,  $p=0,1055$ )

Ci: 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin führte zu einer signifikanten Verschiebung des ( $V_{1/2}$ ) in Richtung Hyperpolarisation. (Kontrolle: -90,08 [-92,49; -88,16] mV,  $n=10$ ; 20 min: -91,22 [-94,17;

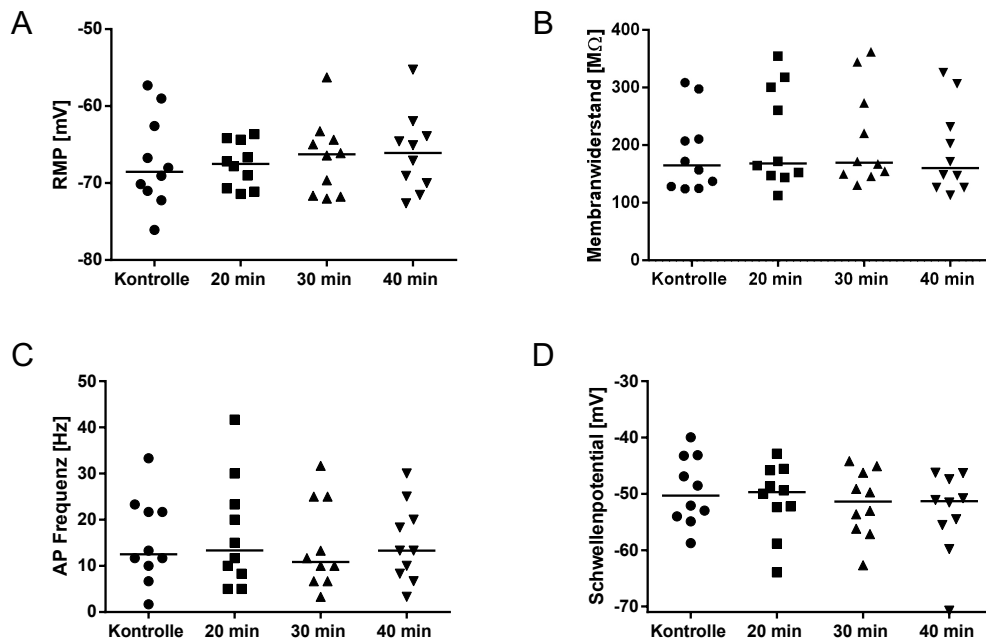
---

-89,57] mV, **p= 0,0020**; 30 min: -93,59 [-93,59; -89,36] mV, **p= 0,0488**; 40 min: -90,55  
[-93,52; -89,01] mV, p= 0,1309)

### **3. Wirkung auf die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone**

Die gesteigerte kortikale Aktivität im EEG könnte über eine erhöhte Erregbarkeit kortikaler Neurone unter dem Einfluss von Ketamin erklärt werden. Um einen potentiellen Effekt von S-Ketamin zu ermitteln, wurden kortikale Neurone der Lamina IV abgeleitet und die Wirkung von S-Ketamin auf die aktiven und passiven Membraneigenschaften untersucht. Weder die passiven noch die aktiven Membraneigenschaften waren unter 10  $\mu$ M S-Ketamin signifikant verändert. Der Zeitpunkt der Messung beeinflusste die Erregbarkeit kortikaler Neurone nicht signifikant (Abb. 18).





**Abbildung 18: Membranphysiologische Eigenschaften kortikaler Neurone der Lamina IV**

**Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n = 10$  für alle Messwerte**

A: S-Ketamin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Ruhemembranpotential. (Kontrolle: -68,54 [-71,48; -62,97] mV; 20 min: -67,50 [-69,71; 65,51],  $p = 0,9219$ ; 30 min: -66,25 [-70,15; 63,13] mV,  $p = 0,6250$ ; 40 min: -66,09 [-69,81; -62,42] mV,  $p = 0,3223$ )

B: Der Membranwiderstand verändert sich nicht signifikant. (Kontrolle: 164,8 [137,7; 236,4] MΩ; 20 min: 168,6 [150,6; 274,9] MΩ,  $p = 0,084$ ; 30 min: 169,7 [151,1; 273,3] MΩ,  $p = 0,0273$ ; 40 min: 160,1 [135,7; 244,4] MΩ,  $p = 0,3750$ )

C: Die Frequenz der Aktionspotentiale war nicht signifikant verändert. (Kontrolle: 12,50 [8,80; 22,20] Hz; 20 min: 13,33 [8,50; 25,50] Hz,  $p = 0,8438$ ; 30 min: 10,83 [7,54; 21,13] Hz,  $p = 0,875$ ; 40 min: 13,33 [8,79; 20,87] Hz,  $p = > 0,999$ )

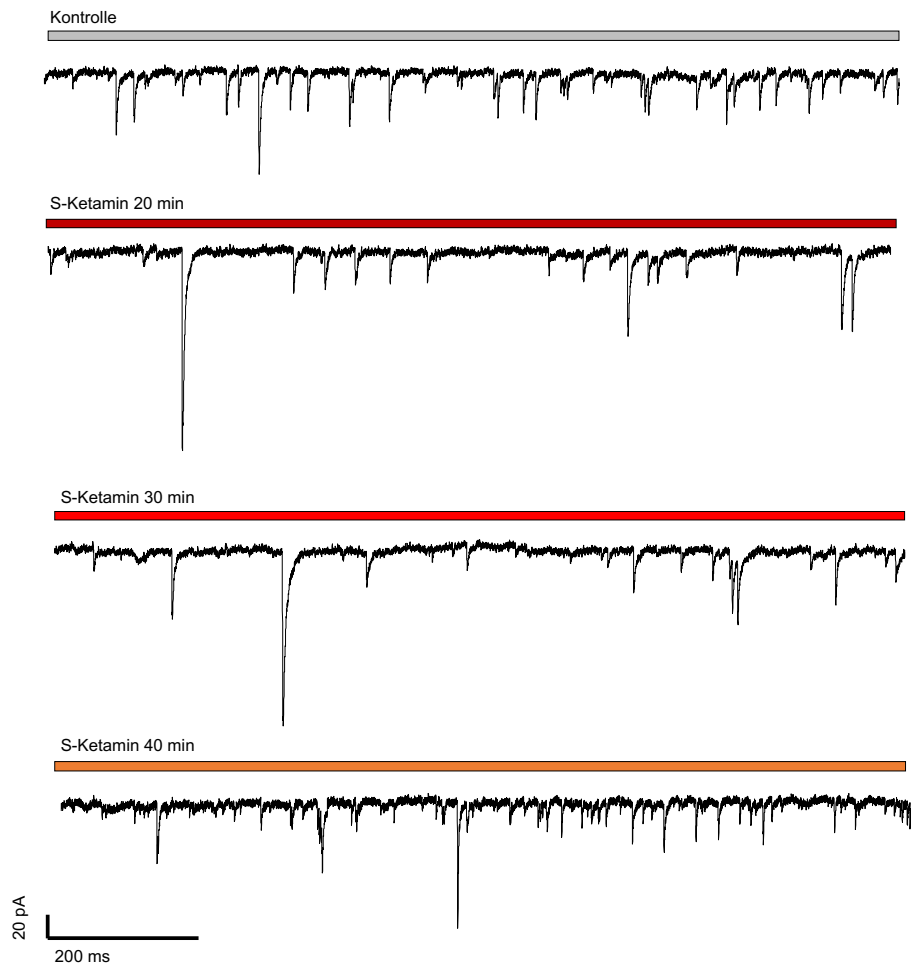
D: Das Schwellenpotentials war nicht signifikant verändert. (Kontrolle: -50,31 [-53,79; -45,10] mV; 20 min: -49,69 [-55,51; -46,42] mV,  $p = 0,4316$ ; 30 min: -51,36 [-55,94; -47,46] mV,  $p = 0,1934$ ; 40 min: -51,31 [-58,74; -48,06] mV,  $p = 0,1309$ )

#### **4. Die Wirkung von S-Ketamin auf GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Ströme**

Spontane GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme wurden im Voltage-Clamp Modus abgeleitet. Es wurde postuliert, dass Ketamin zu einer kortikalen Disinhibition führt (Purdon et al., 2015). Wenn dieses Postulat wahr wäre, würde sich das in einer Verminderung der Amplitude oder Frequenz der spontanen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelten Ströme widerspiegeln. Das Membranpotential der abgeleiteten Zelle wurde konstant auf -70 mV gehalten. Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptorantagonist CGP (5 µM) sowie der AMPA- und Kainat-Rezeptorantagonist NBQX (5 µM) wurden der aCSF hinzugefügt, um die durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelten Ströme zu isolieren. Außerdem wurde eine IZ mit erhöhter Cl<sup>-</sup>-Ionen-Zusammensetzung verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle Nr. 4).

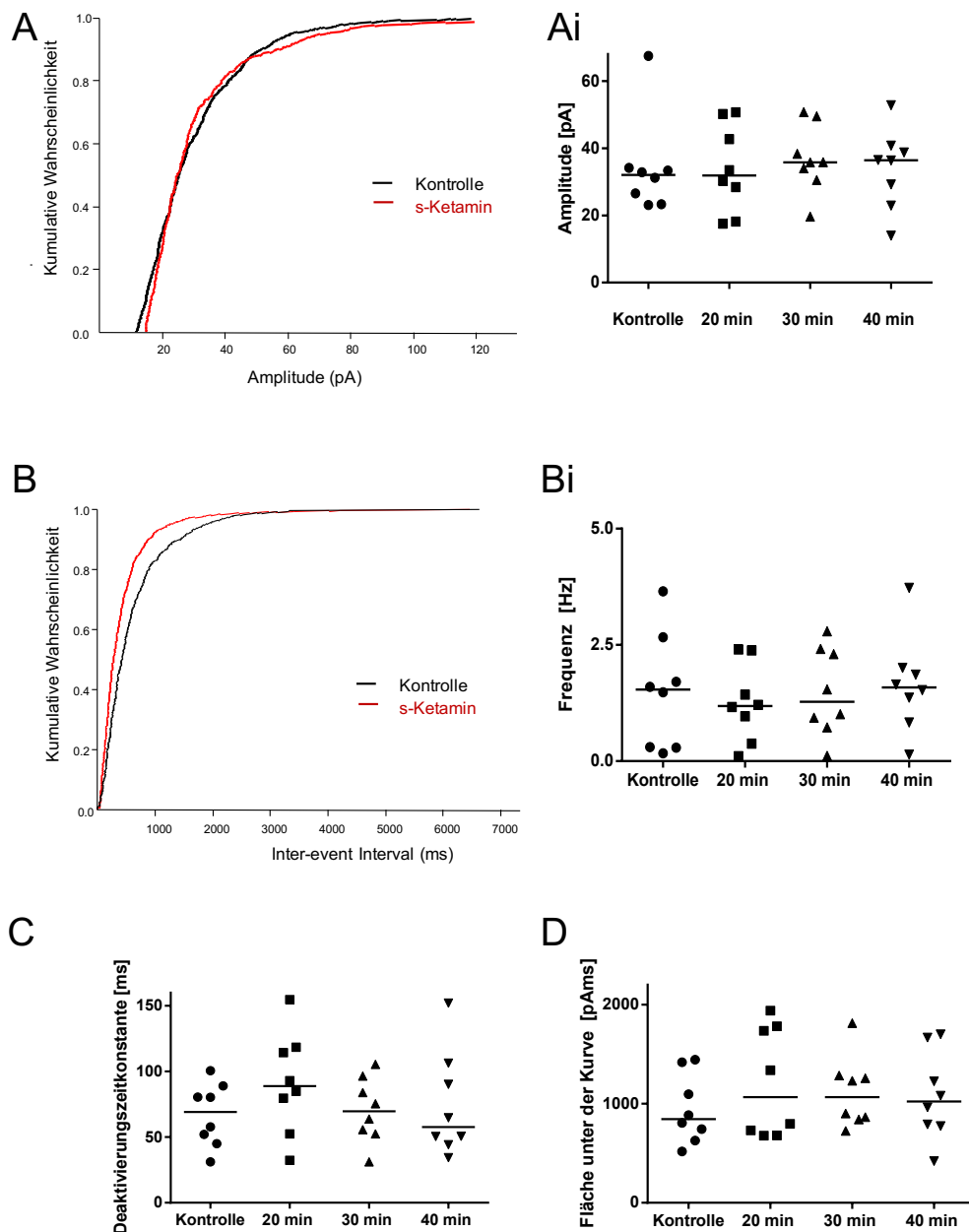
##### **4.1. Die Wirkung von S-Ketamin auf kortikale spontane IPSC**

Spontane inhibitorische postsynaptische Ströme wurden im Kortex in der Lamina IV gemessen. Durch spontane Transmitterfreisetzung werden rezeptorvermittelte Ionenströme an der postsynaptischen Zelle hervorgerufen, die als spontane inhibitorische postsynaptische Ströme bezeichnet werden. Es wurden Daten zur Frequenz, Amplitude, Fläche unter der Kurve sowie der Deaktivierungszeitkonstante erhoben. S-Ketamin in einer Konzentration von 10 µM zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die analysierten Parameter. Eine verminderte Aktivität der sIPSCs und folglich eine Disinhibition, zeigte sich unter dem Einfluss von S-Ketamin nicht (Abb. 19, 20).



**Abbildung 19: Repräsentative Originalspur eines Experiments unter 10  $\mu$ M S-Ketamin**

Weder die Frequenz der evozierten Aktionspotentiale, die Amplitude, die Fläche unter der Kurve, noch die Deaktivierungszeitkonstante veränderten sich unter S-Ketamin signifikant



### Abbildung 20: Die Wirkung von S-Ketamin auf sIPSC

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für jede Messreihe, \* =  $p < 0,05$ . Werte in

Abbildung: Median mit 95%-KI; jeweils  $n=8$  für alle Messwerte

A: Repräsentative Spur einer Kumulativen Verteilung der Amplitude

Ai: S-Ketamin beeinflusste die Amplitude nicht signifikant. (Kontrolle: 32,04 [22,09; 45,90] pA; 20 min: 31,87 [23,07; 44,80] pA,  $p = > 0,9999$ ; 30 min: 35,81 [28,43; 45,17] pA,  $p = 0,4609$ ; 40 min: 36,42 [24,00; 43,80] pA,  $p = > 0,9999$ )

B: Repräsentative Spur einer Kumulativen Verteilung des Inter-event-Intervalls.

Bi: Die Frequenz wurde durch S-Ketamin nicht signifikant beeinflusst. (Kontrolle: 1,54 [0,4487; 2,518] Hz; 20 min: 1,187 [0,5630; 1,946] Hz,  $p = 0,6406$ ; 30 min: 1,277 [0,691; 2,268] Hz,  $p = 0,9453$ ; 40 min: 1,587 [0,77; 2,505] Hz,  $p = 0,7422$ )

C: S-Ketamin zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Deaktivierungszeitkonstante. (Kontrolle: 69,11 [46,95; 87,16] ms; 20 min: 88,92 [58,90; 123,6] ms,  $p=0,078$ ; 30 min: 69,61 [49,95; 91,13] ms,  $p=0,5469$ ; 40 min: 57,71 [40,90; 107,3] ms,  $p=0,7422$ )

D: Auch die Fläche unter der Kurve wurde durch S-Ketamin nicht signifikant verändert (Kontrolle: 845,1 [652,5; 1232,0] pAms; 20 min: 1067 [749,6; 1669] pAms,  $p=0,0781$ ; 30 min: 1066 [817,4; 1411] pAms,  $p=0,1094$ ; 40 min: 1022 [706,8; 1448] pAms,  $p=0,4609$ )

## V. DISKUSSION

In dem vorliegenden Promotionsvorhaben wurde mittels der Patch Clamp Technik der Einfluss des Injektionsanästhetikums S-Ketamin auf die Erregbarkeit thalamokortikaler sowie kortikaler Neurone untersucht. Verschiedene Stimulationsprotokolle mit ihren Strom-Spannungsantworten wurden im Current- bzw. Voltage-Clamp Modus des Messverstärkers aufgezeichnet.

Es konnte gezeigt werden, dass S-Ketamin in klinisch relevanten Konzentrationen lediglich einen geringen inhibitorischen Effekt auf die intrinsische Erregbarkeit der TK-Schaltneurone besitzt. Zusätzlich führt S-Ketamin bei höherer Konzentration zu einer signifikanten Reduktion der  $I_h$  Stromamplitude und verschiebt die Aktivierung spannungsabhängiger HCN-Kanäle mit erhöhter Konzentration in Bereiche mit hyperpolarisierten Membranpotentialen. Daher scheint die in der Literatur beschriebene, unter Ketamin zu beobachtete neuronale Aktivitätssteigerung, konsekutiv ein kortikales Phänomen zu sein (Purdon et al., 2015). Somit wurden sowohl die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lamina IV, sowie spontane GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte inhibitorische postsynaptische Ströme an kortikalen Neuronen untersucht. Allerdings zeigte auch hier S-Ketamin keine signifikanten Effekte. Die kortikale Aktivitätssteigerung unter S-Ketamin liegt daher nicht, wie ursprünglich vermutet, einer kortikalen Disinhibition zugrunde. Vielmehr suggerieren die Ergebnisse der vorliegenden Studie einen durch die Modulation exzitatorischer Rezeptoren vermittelten Mechanismus.

Es ist unwahrscheinlich, dass ein einzelner zellulärer Mechanismus für den Bewusstseinsverlust verantwortlich ist. In klinisch relevanten Konzentrationen modulieren Anästhetika die neuronale Erregbarkeit sowie die synaptische Übertragung. Daraus resultiert eine Verminderung der Aktivität in kortikalen und subkortikalen Netzwerken, die essentiell für das Bewusstsein sind (Franks, 2008). Verschiedene Kombinationen aus reduzierter neuronaler Exzitation, erhöhter K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit und Inhibition von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen könnten die deutlich unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Anästhetika erklären.

## 1. Klinische Relevanz der Ketaminkonzentration

Ketamin induziert einen Zustand der dissoziativen Anästhesie in Tieren (McCarthy et al., 1965; Chen et al., 1966) und Menschen (Domino et al., 1965). Eine maximale Plasmakonzentration von 5-10  $\mu\text{M}$  in Menschen und 20  $\mu\text{M}$  in Ratten (Cohen et al., 1973) ist notwendig, um den Zustand der dissoziativen Anästhesie zu erreichen (Little et al., 1972; Idvall et al., 1979). Die durchschnittliche konstante Plasmakonzentration zum Erreichen einer Anästhesie wurde mit 9,3  $\mu\text{M}$  angegeben (Idvall et al., 1979; Zanos et al., 2018). In einer Studie von Cohen et al. (1973) wurde die Konzentration von Ketaminmetaboliten im Gehirn nach Applikation in die Schwanzvene gemessen. Innerhalb von 1 min nach Applikation wurden bereits maximale Plasmakonzentrationen erreicht (Cohen et al., 1973). Die Studie belegt die schnelle Passage der Blut-Hirn-Schranke mit Anreicherung in kortikalen Strukturen, weshalb die angegebenen Plasma Konzentrationen höchst wahrscheinlich der Konzentration im Gehirn entsprechen. Bei Kindern führte die Applikation von 2 mg/kg KG S-Ketamin zu einer Konzentration von  $1860 \pm 883 \text{ ng/ml}$  (Weber & Wulf, 2004). Bei einer Molmasse von 237 g/L entspricht eine 5  $\mu\text{M}$  Konzentration 1.185 ng/ml. Die im Rahmen dieses Promotionsvorhabens verwendeten Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  liegen somit im Bereich der klinischen Relevanz, wobei 30  $\mu\text{M}$  mit Sicherheit am oberen Dosisbereich klinischer Anwendungen liegt. Die in vorausgegangenen Arbeiten zum Teil verwendeten, deutlich höhere Konzentrationen (30  $\mu\text{M}$  -1000  $\mu\text{M}$ ) (Fu et al., 2017) sind beim Menschen klinisch nicht realistisch und entsprechen einem Erreichen oder Überschreiten der  $\text{LD}_{50}$  von ca. 85  $\mu\text{M}$  entsprechend 35 mg/kg Körpergewicht.

Bei Pferden führte eine klinisch applizierte Bolusdosis von 2,2 mg/kg Ketamin schon nach 2 Minuten zu einer Plasmakonzentration über 3000 ng/ml mit Bewusstlosigkeit. Fiel die Plasmakonzentration auf oder unter 1000 ng/ml, erlangten die Pferde das Bewusstsein zurück (Waterman et al., 1987). Die in dieser Arbeit verwendete niedrigste Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  S-Ketamin entspricht 1185 ng/ml und liegt somit im unteren anästhetischen Bereich. Auch bei 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  handelt es sich dabei um in der Veterinärmedizin übliche Konzentrationen, die sich aus der klinischen Erfahrung ergeben. Werden Konzentrationen unter 5  $\mu\text{M}$  verwendet, werden zwar messbare

Plasmakonzentrationen zwischen 230 und 407 ng/ml detektiert, die jedoch nicht zum Bewusstseinsverlust führen (Lankveld et al., 2006).

Ketamin ist aus mehreren Gründen einzigartig in der Klasse der Allgemeinanästhetika. Auf molekularer Ebene ist der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor nicht das primäre Ziel für Ketamin, im Gegensatz zu vielen Wirkstoffen, die zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Allgemeinanästhesie verwendet werden. Man geht vielmehr davon aus, dass Ketamin durch Antagonisierung glutamaterger NMDA-Rezeptoren, wie z.B. die Inhalationsanästhetika Lachgas und Xenon sowie durch eine Modulation von HCN-Kanälen wirkt (Yamamura et al., 1990; Chen et al., 2009; Zhou et al., 2013; Mattusch et al., 2015). Auf neurochemischer Ebene ist Ketamin einzigartig, weil es die kortikalen Acetylcholinpiegel erhöht und seine Wirkung von noradrenergen Signalen abhängig zu sein scheint. Dies steht im Gegensatz zu einer Reihe von anderen GABAergen Anästhetika (Kikuchi et al., 1997; Kushikata et al., 2011). Ketamin aktiviert nicht den ventrolateralen präoptischen Kern, einen schlaffördernden Kern im Hypothalamus, der durch häufig verwendete Anästhetika wie Propofol und Isofluran aktiviert wird; stattdessen aktiviert es den wachheits-fördernden Locus coeruleus (Lu et al., 2008). Darüber hinaus scheint Ketamin im Gegensatz zu praktisch allen anderen Anästhetika und Sedativa den Energieumsatz des Thalamus nicht zu vermindern (Långsjö et al., 2005). Auch bei Hunden konnte nach Verabreichung von subanästhetischen Dosen von 2 mg/kg ein gesteigerter Blutfluss im linken frontalen Kortex und Thalamus festgestellt werden. Neurophysiologisch nimmt Ketamin eine Sonderstellung ein, da es den Anteil an hochfrequenter oszillatorischer Aktivität im Elektroenzephalogramm erhöht, anstatt sie wie die meisten Anästhetika zu verringern (Maksimow et al., 2006). Ketamin scheint also den Bewusstseinsverlust über spezifische Mechanismen hervorzurufen.

## **2. Die Wirkung von S-Ketamin auf die intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen**

Alkire et al. (2000) postulierten, dass Anästhetika den Bewusstseinsverlust durch eine verminderte thalamische Aktivität hervorrufen. Die TK-Schaltneurone können zwei verschiedene Aktivitätsmodi einnehmen. Durch eine Hyperpolarisation werden sie von einem tonischen Aktivitätsmuster in den sog.



Burst Modus überführt (Steriade et al., 1992), dem eine wichtige Rolle im Schlafzyklus zukommt. Der Burst Modus ist durch langsame, rhythmische Aktionspotentialfolgen charakterisiert. Dieses Aktivitätsmuster hemmt den Informationstransfer zum Kortex und ist somit möglicher Wirkmechanismus der Anästhetika (Huguenard & McCormick, 2007). Eine Veränderung der intrinsischen Membraneigenschaft (z.B. Ionenleitfähigkeit), die zur erschwerten Aktionspotentialgenerierung führt, stellt eine denkbare Wirkweise dar, über die Anästhetika die neuronale Erregbarkeit hemmen könnten. So können Anästhetika über eine Potenzierung des auswärts gerichteten  $K^+$ - Stroms oder eine Reduktion des einwärts-gerichteten  $Na^+$ - oder  $Ca^{2+}$ - Stroms zur Membranhyperpolarisation führen, welches in erniedrigter Erregbarkeit der Zelle resultiert (Krnjevic & Puil, 1997).

Mit Ausnahme der AP-Frequenz, die unter 30  $\mu M$  S-Ketamin nach 30 min signifikant vermindert war, zeigte S-Ketamin keine signifikanten Effekte auf die aktiven und passiven Membraneigenschaften TK-Schaltneurone. Selbst hohe Konzentrationen von S-Ketamin führten zu keiner Veränderung. Zwischen den injizierbaren Anästhetika scheint es substanzspezifische Unterschiede zu geben. So führt das Injektionsanästhetikum Propofol in TK-Schaltneuronen des ventrobasalen (VB)-Kernkomplexes zu einer Hyperpolarisation des RMPs und einer signifikanten Reduktion des Membranwiderstandes, resultierend in einer verminderten Erregbarkeit TK-Schaltneurone (Ying et al., 2006). Der verminderte Membranwiderstand schien in dieser Arbeit  $GABA_A$ -Rezeptor vermittelt zu sein. Selbst drei Stunden nach intraperitonealer Injektion von Propofol, verglichen mit der Kontrollgruppe, war der Membranwiderstand noch signifikant vermindert und das AP-Schwellenpotential in Richtung Depolarisation verschoben (Ying et al., 2006).

In Hinblick auf weitere Anästhetika Klassen zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede zu S-Ketamin. Für das volatile Anästhetikum Isofluran konnten signifikante Veränderungen der aktiven und passiven Membraneigenschaften gezeigt werden. Eine reduzierte AP-Frequenz, eine Verminderung des Membranwiderstands, eine Verschiebung der Aktionspotentialschwelle in stärker depolarisierte Bereiche, sowie eine dosisabhängige Hyperpolarisation des RMPs mündeten letztlich in eine verminderte intrinsische Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen (Ries & Puil, 1999a und 1999b). Auch Eckle und Kollegen (2012) untersuchten die Auswirkungen Isoflurans auf TK-Schaltneurone, sahen

allerdings keine signifikanten Veränderungen des RMPs und des Membranwiderstandes. Als mögliche Erklärung dieser divergierenden Ergebnisse wird auf interne biologische Variabilität zwischen den Versuchstieren, verschiedene Umwelt-, Ernährungs- und Haltungsbedingungen sowie unterschiedliche Versuchsbedingungen verwiesen (Eckle et al., 2012). Auch das Edelgas Xenon führte in funktionellen Bildgebungsstudien zu einer Reduktion des thalamischen Metabolismus (Rex et al., 2006). Allerdings wurde kein signifikanter Effekt auf das RMP, die AP-Frequenz oder das Schwellenpotential von APs festgestellt, es kam sogar zu einer Zunahme des Membranwiderstandes (Mattusch et al., 2015). HCN-Kanäle vermitteln größtenteils die neuronale Leitfähigkeit bei hyperpolarisierten Membranpotentialen (Biel et al., 2009). Sowohl HCN-Kanäle als auch Zwei-Poren-Domäne- $K^+$ -Ströme beeinflussen die Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen durch Stabilisierung des Membranpotentials (Moosmang et al., 1999; Kim et al., 2005; Goldstein & Bockenhauer, 2001). Frühere Studien haben gezeigt, dass volatile Anästhetika TASK-Kanäle aktivieren (Budde et al., 2008; Patel et al., 1999). Dies führt zu einer Membranhyperpolarisation, die mit einer reduzierten Erregbarkeit in den thalamokortikalen Neuronen verbunden ist (Patel & Honore, 2001; Franks & Honore, 2004). Da die duale Modulation sowohl der HCN- als auch der TASK-Kanal-vermittelten Ströme der effizienteste Weg zur Modulation des Membranpotentials ist (Meuth et al., 2006), kann das Fehlen eines Xenon-induzierten Effekts auf die TASK-Kanäle die Ergebnisse erklären, dass weder das RMP, noch die Schwelle oder die Frequenz der Aktionspotentiale durch relevante Xenon-Konzentrationen verändert wurde. Mit Blick auf den anästhetika-vermittelten Bewusstseinsverlust kann dies als weiterer Hinweis für ausgeprägte substanzspezifische Unterschiede verstanden werden (Rudolph & Antkowiak, 2004).

Mit Ausnahme von S-Ketamin haben die beschriebenen Anästhetika jedoch eine Eigenschaft gemeinsam: sie reduzieren die Aktivität im Thalamus. Die Divergenz der bereits publizierten und in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse beweist abermals eine Sonderstellung des Ketamins unter den Anästhetika. Es ist unwahrscheinlich, dass ein einzelner zellulärer Mechanismus für den Bewusstseinsverlust verantwortlich ist, weshalb unter anderen molekularen Zielstrukturen auch die im Thalamus stark exprimierten HCN-Kanäle als Zielstruktur in Frage kommen.

### **3. Die Wirkung von S-Ketamin auf den HCN-Kanal vermittelten Voltage Sag und Rebound Burst Delay**

Die durch Hyperpolarisation aktivierten HCN-Kanäle sind spannungsgesteuerte Ionenkanäle, die für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen durchlässig sind und sich bei Potentialen von mehr als -50 mV öffnen (Pape, 1996; Robinson & Siegelbaum, 2003; Biel et al. 2009). Diese Kanäle sind daher bei normalen RMPs der meisten Neuronen aktiv und tragen zur Stabilisierung dessen bei. Darüber hinaus regulieren HCN-Kanäle den Membranwiderstand. Indem sie sowohl das RMP als auch den Membranwiderstand beeinflussen, haben HCN-Kanäle einen entscheidenden Einfluss auf die intrinsische neuronale Erregbarkeit, die Integration des synaptischen Potenzials und die Freisetzung von Neurotransmittern (Biel et al., 2009; Robinson & Siegelbaum, 2003).

Durch die vorliegende Arbeit wurden einige Wirkungen des S-Ketamins aufgedeckt, die durch eine Modulation von HCN-Kanälen hervorgerufen werden. Durch den applizierten Hyperpolarisationspuls werden die HCN-Kanäle aktiviert, der depolarisierende Einwärtsstrom repolarisiert das Membranpotential zurück in Richtung des RMP. Dieser Effekt charakterisiert TK-Schaltneurone und wird als „Voltage Sag“ bezeichnet (Biel et al., 2009). Nach Beendigung der Hyperpolarisation wird eine Salve von Aktionspotentialen, der sog. „Rebound Burst“ ausgelöst, dem eine Nachdepolarisation folgt (Ying & Goldstein, 2005). Als „Rebound Burst Delay“ wird dabei die zeitliche Verzögerung von dem Beginn der Repolarisation bis zur Spitze des 1. Aktionspotentials beschrieben. In TK-Schaltneuronen wird der depolarisierende  $I_h$  Strom, welcher den Voltage Sag vermittelt, hauptsächlich von HCN2-Kanälen vermittelt (Ludwig et al., 2003). Eine inverse Korrelation zwischen der Amplitude des Voltage Sags und dem Rebound Delay in dopaminergen Neuronen des Hirnstamms, sowie in TK-Schaltneuronen, konnte bereits gezeigt werden (Neuhoff et al., 2002; Ying et al., 2006).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass S-Ketamin dosisabhängig ab 10  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten, wenn gleich auch nur geringen Abnahme des Voltage Sags führt und eine Verlängerung des Rebound Burst Delays induziert. Im Vergleich zu anderen Anästhetika Klassen sind diese Veränderungen jedoch gering (Ying et al.,

2006; Mattusch et al., 2015). Eine Modulation der HCN-Kanäle durch Anästhetika wurde bereits in anderen Arbeiten als ursächlich für eine verminderte neuronale Aktivität beschrieben (Ying et al., 2006; Mattusch et al., 2015). Die Applikation von klinisch relevanten Dosierungen von 5  $\mu$ M Propofol führten zu einer fast vollständigen Abnahme des Voltage Sags, wobei kein additiver Effekt durch die Zugabe des spezifische HCN-Kanalblockers ZD7288 beobachtet werden konnte (Ying et al., 2006). Auch der Rebound Burst Delay war unter 5  $\mu$ M Propofol deutlich verlängert. Ähnlich verhält sich das Edelgas Xenon. Die Amplitude des Voltage Sags verminderte sich um ca. 43% und der Rebound Delay verlängerte sich um ca. 39,5 % (Mattusch et al., 2015).

Der unter S-Ketamin zu beobachtende Effekt, welcher maßgeblich durch HCN2-Kanäle vermittelt wird, ist zwar signifikant, führt aber zu keiner Veränderungen der aktiven und passiven Membraneigenschaften der TK-Schaltneurone. Der  $V_{(1/2)}$  Wert beschreibt das Membranpotential, bei dem 50 % aller Kanäle geöffnet sind. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von S-Ketamin, liegt dieser in Hyperpolarisationsbereichen zwischen -80 bis -95 mV. Da die aktiven und passiven Membraneigenschaften in Bereichen nahe des RMP bestimmt wurden, liegt es nahe, dass unter diesen Messbedingungen lediglich wenige HCN-Kanäle aktiv sind und somit hier kein signifikanter Effekt detektiert werden kann. Inwiefern die Abnahme des Voltage Sags und die Verlängerung des Rebound Bursts zu dem Anästhetika vermittelten Bewusstseinsverlust beitragen, und infolgedessen ihre physiologische Relevanz, wird kontrovers diskutiert (Chen et al., 2009; Ying et al., 2006). Die hier beobachteten Effekte zeigen jedoch eine geringgradig verminderte Erregbarkeit der TK-Schaltneurone, welche meist durch HCN-Kanäle vermittelt werden und infolgedessen noch näher betrachtet wurden.

#### **4. Die Wirkung von S-Ketamin auf den HCN-Kanal vermittelten Kationenstrom $I_h$ und das Potential der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ )**

TK-Schaltneurone können zwei verschiedene Funktionszustände einnehmen: während Phasen der Wachheit werden tonische Folgen schneller Aktionspotentiale infolge einer Depolarisation des Membranpotentials erzeugt und ermöglichen somit eine Weiterleitung der Sinnessignale. Im Schlaf generieren

Neurone durch Hyperpolarisation des Membranpotentials langsame, rhythmische Oszillationen (Pape et al., 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass Anästhetika das Membranpotential von TK-Schaltneuronen hyperpolarisieren und damit ihre Erregbarkeit hemmen. HCN-Kanäle tragen maßgeblich zur Stabilisierung des Membranpotentials sowie zur thalamischen Erregbarkeit und oszillatorischer Aktivität und infolge dessen zur Regulierung der Bewusstseinszustände bei (McCormick & Pape, 1990; Robinson & Siegelbaum, 2003; Ying et al., 2006). Der durch Hyperpolarisation aktivierte Kationenstrom  $I_h$  reguliert die Erregbarkeit und das rhythmische Feuern in TK-Schaltneuronen im VB-Kernkomplex des Thalamus (Robinson & Siegelbaum, 2003). Die Isoformen HCN2 und HCN4 werden in den thalamischen Neuronen stark exprimiert, wobei  $I_h$  Ströme hauptsächlich von HCN2-Kanälen vermittelt werden (Ludwig et al., 2003). Die Modulation des thalamischen  $I_h$ - Stroms könnte somit einen zusätzlichen Mechanismus darstellen, durch den Anästhetika die thalamische Aktivität modulieren.

In klinisch relevanten Konzentrationen wurden im wesentlichen 2 verschiedene Effekte von S-Ketamin auf native HCN-Kanäle in TK-Schaltneuronen nachgewiesen: Zum einen kam es konzentrationsabhängig ab 30  $\mu\text{M}$  zu einer Verringerung der maximalen  $I_h$ - Amplitude (bei einem Membranpotential von -133 mV), zum anderen, zwar nur zu einer geringen, aber signifikanten Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ ) in hyperpolarisierende Bereiche.

Für das Injektionsanästhetikum Propofol zeigten Ying et al. (2006) eine deutlich verminderte Erregbarkeit TK-Schaltneurone über eine Suppression des  $I_h$ , was zur thalamokortikalen Aktivitätsverminderung beizutragen scheint. Die maximale  $I_h$ - Amplitude war unter Propofol deutlich vermindert, und auch  $V_{1/2}$  war in deutlich hyperpolarisierende Bereiche verschoben. Die Funktion des HCN-Kanals in thalamischen Neuronen ist cAMP-sensitiv (Lüthi & McCormick; Biel et al., 2009), jedoch ist die Sensitivität gegenüber cAMP abhängig von der HCN-Isoform (Ludwig et al., 1999). Des weiteren beschleunigt cAMP die Aktivierungskinetik HCN-Isoformspezifisch und verschiebt  $V_{1/2}$  um 2 bis 20 mV zu positiveren Potentialen (Ludwig et al., 1999; Biel et al., 2009). Für Propofol wurde jedoch ein unabhängiger Effekt von cAMP gezeigt (Ying et al., 2006).

Chen et al. (2009) untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss von Ketamin (20  $\mu\text{M}$ ) auf homomere HCN1-Kanäle in HEK293 Zellen, sowie HCN1-Knockoutmäusen.

In homomeren HCN1 exprimierenden Zellen war die spannungsabhängige Aktivierung in hyperpolarisierende Bereiche verschoben und die maximale Stromamplitude verringert. Derselbe Effekt, wenn auch geringer, wurde in Heteromeren HCN1/HCN2-Kanälen beobachtet. Im Gegensatz dazu blieben HCN2-Kanäle unbeeinflusst, selbst wenn die endogene allosterische Hemmung der HCN2-Kanäle in Gegenwart von sättigendem intrazellulären cAMP aufgehoben wurde und somit aktivierend wirkte (Chen et al., 2009). Diese Studien zeigen HCN1-Kanäle als bisher nicht erkannte molekulare Ziele für Ketamin und legitimieren diese Kanäle als klinisch relevante Substrate für hypnotische Wirkungen von Anästhetika (Chen et al., 2009).

Die Isoform des HCN-Kanals scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Wirkung von Anästhetika zu haben. Eine Veränderung der HCN-Kanal Expression mit der postnatalen Entwicklung kann zur Empfindlichkeit gegenüber den hypnotischen Wirkungen von Ketamin bei Mäusen beitragen (Gao et al., 2018). Eine verminderte Expression von HCN2-Kanälen im Kortex konnte mit fortschreitender Entwicklung von Mäusen gezeigt werden, während die HCN1 Expression mit fortschreitender Entwicklung zunahm (Gao et al., 2018). Mäuse im Alter von 35 Tagen exprimierten 50% weniger HCN2-Kanäle als 21 Tage alte Mäuse (Gao et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden Tiere im Alter zwischen 21-35 Tage verwendet. Die kombinierten Expressionsänderungen der HCN1- und HCN2-Kanäle im Kortex lassen vermuten, dass die erhöhte Expression der HCN1-Kanäle und die verminderte Expression der HCN2-Kanäle zu den unterschiedlichen Auswirkungen der intravenösen Anästhetika auf den HCN-Strom beitragen könnten. Die Ergebnisse liefern primäre Beweise für altersbedingte Veränderungen in der Untereinheitenzusammensetzung der HCN-Kanäle (Gao et al., 2018).

Neben Ketamin führen auch volatile Anästhetika wie Halothan und Isofluran dosisabhängig zu einer Verschiebung von  $V_{(1/2)}$  in hyperpolarisierende Bereiche und einer Abnahme der  $I_h$ - Amplitude (Chen et al., 2005). Hierbei ist der Effekt auch von der HCN-Kanal-Isoform abhängig. In HCN1-Kanälen fiel der Hyperpolarisationsshift deutlich prominenter aus als in HCN2-Kanälen. Die in TK-Schaltneuronen maßgebliche Vermittlung des Kationenstroms  $I_h$  über HCN2-Kanäle könnte das unterschiedliche Ausmaß des Hyperpolarisationsshift erklären (Ludwig et al., 2003). Auch die Abnahme der  $I_h$ -Amplitude war HCN-Isoform abhängig. So wurde in HCN1-Kanälen keine signifikante Abnahme beobachtet,

wohingegen in HCN2-Kanälen Halothan die Amplitude um ca. 27% und Isofluran um ca. 20% verminderte (Chen et al., 2005). Auch das Inhalationsanästhetikum Xenon löste bei klinisch relevanter Konzentration eine Verschiebung von  $V_{(1/2)}$  in deutlich hyperpolarisierende Bereiche aus (Mattusch et al., 2015). Eine Modulation durch cAMP führte im Fall von Xenon jedoch zur Aufhebung der Wirkung auf  $V_{(1/2)}$  und die  $I_h$ -Amplitude. Dies deutet daraufhin hin, dass Xenon die Funktion der HCN-Kanäle beeinflusst, entweder über eine Verringerung von intrazellulärem cAMP oder durch einen Antagonismus an der cAMP-Bindungsstelle (Mattusch et al., 2015).

In unseren Untersuchungen fand sich nur unter 30  $\mu$ M S-Ketamin eine signifikante Abnahme der Amplitude um ca. 18,27 % (20 min), 23,44 % (30 min) und 24,27 % (40 min). Im Vergleich zu Xenon, bei dem die Amplitude um ca. 33,4 % reduziert war, ist der Effekt eher gering (Mattusch et al., 2015). Ein Effekt auf HCN-Kanäle konnte unter S-Ketamin gezeigt werden, jedoch war dieser eher gering und scheint daher nicht relevant zu sein. Die Effekte von Ketamin auf HCN-Kanäle scheinen Isoformspezifisch zu sein, insbesondere auf HCN1-Kanäle (Chen et al., 2009). Da im Thalamus hauptsächlich HCN2-Kanäle exprimiert werden, und ein geringer Effekt von S-Ketamin in dieser Arbeit beobachtet wurde, stehen unsere Ergebnisse in Divergenz mit der Arbeit von Chen et al., die keinen Effekt von Ketamin auf HCN2-Kanäle sahen (Chen et al., 2009). Die Ausbleibende Wirkung am HCN2-Kanal unterstreicht abermals Ketamins Sonderstellung unter den Anästhetika.

Zusammenfassend hemmt S-Ketamin die Erregbarkeit von TK-Schaltneuronen, allerdings wahrscheinlich unabhängig von HCN2-Kanälen. Die Aktivitätszunahme im EEG lässt sich also dadurch auch nicht erklären. In den ersten Studien zu den Auswirkungen von Halothan und Isofluran wurde erstmals der Thalamus als gemeinsamer Ort der regionalen Suppression identifiziert (Alkire et al., 2000). Diese Beobachtung führte zu der Theorie eines thalamischen Bewusstseinsschalters, die postuliert, dass ein Hyperpolarisationsblock der thalamokortikalen Neuronen die Funktion der für das Bewusstsein notwendigen thalamokortikalen Schaltkreise beeinträchtigt (Alkire et al., 2000). Ob der Thalamus dabei selbst primäres Ziel der Anästhetika ist oder ob seine Veränderungen nur indirekte Auswirkungen auf andere Bereiche des Gehirns widerspiegeln, wird immer noch vielseitig diskutiert (Mashour, 2015). Die in der funktionellen Bildgebung gezeigte Aktivitätssteigerung im Thalamus wäre



folglich die Konsequenz einer primären erhöhten kortikalen Aktivität mit sekundärer thalamischer Aktivierung über kortikothalamische Neurone (Velly et al., 2007; Alkire et al., 2005), weshalb im nächsten Schritt die Erregbarkeit kortikaler Neurone untersucht wurde.

## **5. Die Wirkung von Ketamin auf die intrinsische Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lamina IV**

Bildgebungsstudien haben gezeigt, dass die Auswirkungen von Anästhetika eher regionaler als globaler Natur sind (Heinke & Schwarzbauer, 2002). Insbesondere subkortikalen Strukturen, wie dem Thalamus, scheint eine zentrale Rolle im anästhetika-induzierten Bewusstseinsverlust zuzukommen (Bonhomme et al., 2001; Fiset et al., 1999). Nahezu alle sensorischen Informationen gelangen über den Thalamus in den Neokortex. Der Informationsaustausch ist ein dynamischer Prozess, der eine wechselseitige Kommunikation zwischen Thalamus und Kortex beinhaltet. Dabei übersteigen absteigende kortikothalamische Axone die Zahl der aufsteigenden thalamokortikalen Axone um das zehnfache (Sherman & Koch, 1986). 30-40% des sensorischen Input erhält der Thalamus über kortikothalamische Axone (Liu et al., 1995; Van Horn et al., 2000). Dies lässt darauf schließen, dass der Kortex einen starken Einfluss auf die thalamische Aktivität hat und infolgedessen über die Feedbackfasern auch auf seinen eigenen sensorischen Input (Crandall et al., 2015). In dieser Arbeit wurden Pyramidenzellen der Lamina IV im somatosensorischen Kortex abgeleitet, da sie ihre Afferenzen hauptsächlich von thalamokortikalen Projektionsfasern aus den spezifischen Thalamuskernen erhalten (Palmer et al., 2001). Die thalamische Information durchläuft zuerst die intrakortikale Signalverarbeitung in der Lamina IV. Von dort werden die Informationen an die supragranulären Laminae, beispielsweise Lamina I und Lamina II weitergeleitet (Jones, 2002). Eine anästhesieinduzierte Modulation von Neuronen in Lamina IV könnte daher zu einer Beeinträchtigung der kortikalen Ausbreitung von Signalen führen, die im Thalamus initiiert werden. Die kortikale Lamina VI enthält Pyramidenzellen, die eine exzitatorische Rückkopplung zum Thalamus liefern (Alitto & Usrey, 2003). Zusammen mit der kortikalen Schicht IV stellt sie einen wichtigen Teil der Kommunikationsstruktur zwischen Thalamus und Kortex dar.



Eine direkte Hemmung der neuronalen Erregbarkeit kortikaler Neurone und infolgedessen eine veränderte intrakortikale Informationsverarbeitung stellt auch einen möglichen Wirkmechanismus für den anästhetika-induzierten Bewusstseinsverlust dar. Eine gesteigerte Erregbarkeit der kortikalen Pyramidenneuron der Lamina IV unter S-Ketamin würde die zu beobachtenden Effekte im EEG erklären. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Die Applikation von 10  $\mu$ M S-Ketamin führte zu keinem der drei Messzeitpunkte zu einer signifikanten Veränderung der Erregbarkeit kortikaler Neurone der Lamina IV.

Gemeinhin wird die Ansicht vertreten, dass die Wirkung von Anästhetika zu einem großen Teil durch subkortikale neuronale Netzwerke vermittelt wird (Alkire et al., 2000). Anästhetika modulieren so die Erregbarkeit kortikaler Neurone (Moruzzi & Magoun, 1949; Steriade, 1996). Da der Neokortex jedoch eine hohe Dichte an molekularen Zielstrukturen von Anästhetika besitzt, insbesondere GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, sollte der Neokortex selbst sehr empfindlich auf Anästhetika reagieren. Eine Verstärkung GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelter synaptischer Transmission im Kortex konnte bereits durch Anästhetika gezeigt werden (Franks & Lieb, 1994; Franks & Lieb, 1998; Banks & Pearce, 1999; Nishikawa & MacIver, 1996). Es wurden jedoch hauptsächlich Konzentrationen verwendet, die eine Immobilität induzieren. Da zur Auslösung von Immobilität deutlich höhere Konzentration als zur Auslösung von Sedation und Hypnose erforderlich sind (Stoelting et al., 1970), liefern diese Untersuchungen folglich wenig Einblicke in die kortikalen Mechanismen der Anästhesie.

Hentschke et al. (2005) beschäftigten sich in ihrer Arbeit mit der Frage, inwieweit der Neokortex selbst ein relevantes Ziel volatiler Anästhetika ist (Hentschke et al., 2005). Sie verglichen die Auswirkungen von Isofluran, Enfluran und Halothan auf die potentielle spontane Aktivität neokortikaler Neuronen der Ratte in vivo und in isolierten kortikalen Netzwerken in vitro, d.h. einerseits bei Vorhandensein und andererseits in Abwesenheit subkortikaler Erregungssysteme. Eine Verringerung der spontanen Entladungsrate von Neuronen durch Anästhetika über intrakortikale Mechanismen wurde beobachtet. Konzentrationen, die beim Menschen Hypnose induzieren, reduzierten die Entladungsraten sowohl in vivo als auch in vitro im gleichen Ausmaß um etwa 50% (Hentschke et al., 2005). Diese Abnahme der neuronalen Aktivität ging mit einer signifikanten Verstärkung der neokortikalen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten Hemmung einher. Diese Ergebnisse stellen die

Vorstellung von vorwiegend subkortikalen Effekten von volatilen Anästhetika in Frage und legen nahe, dass intrakortikale Ziele, darunter neokortikale GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die sedierenden und hypnotischen Eigenschaften von volatilen Anästhetika vermitteln.

Alkire et al. (1997; 1999), die den Glukosestoffwechsel im menschlichen Gehirn vor und während der Narkose verglichen, zeigten, dass Halothan und Isofluran den zerebralen Stoffwechsel um 40-50 % verminderten. Es scheint sehr wahrscheinlich, dass die Auswirkungen von Halothan und Isofluran auf den menschlichen Hirnstoffwechsel Veränderungen der spontanen Aktionspotential Aktivität widerspiegeln oder sogar weitgehend aus diesen resultieren.

Zentner und Mitarbeiter (Zentner et al., 1992) untersuchten die Auswirkungen von Halothan, Isofluran und Enfluran auf Muskelkontraktionen, die durch elektrische Stimulation des motorischen Kortex bei wachen und betäubten Kaninchen ausgelöst werden. Konzentrationen flüchtiger Anästhetika in der Nähe der Minimalen alveolären Konzentration <sub>awake</sub> (MAC<sub>awake</sub>) dämpften die evozierten Reaktionen um etwa 50%. Dieser Effekt war auf eine verminderte Erregbarkeit der kortikalen, nicht aber der spinalen Neuronen zurückzuführen. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie an menschlichen Probanden erzielt, die sich einer transkraniellen magnetischen Stimulation des motorischen Kortex unterzogen (Kalkman et al., 1991). Abgesehen davon, dass die Depression der anhaltenden Aktivität im Neokortex möglicherweise eine funktionell relevante anästhetische Wirkung an sich darstellt, könnte sie als ein Indikator für die Abnahme der kortikalen Erregbarkeit angesehen werden. Dies wäre zweifellos eine wichtige und beabsichtigte Folge der Anwesenheit von Anästhetika im Gehirn (Hentschke et al., 2005).

Alkire und Kollegen (2008) vermuteten, dass der Bewusstseinsverlust entweder durch einen Verlust der kortikalen Integration oder durch eine Verringerung der Informationskapazität entsteht. Dies bedeutet, dass entweder die Verarbeitung relevanter Informationen während der anästhesiebedingten Bewusstlosigkeit beeinträchtigt oder gestört wird oder dass die Aktivitätsmuster, die die Informationen repräsentieren, reduziert werden. Elektrophysiologische Studien zeigen, dass Anästhetika den Informationsgehalt im Signal vermindern und den gerichteten Informationsfluss stören oder beeinträchtigen, d.h. eine Beeinträchtigung der kortikalen Feedback-Konnektivität und der frontal-parietalen Kommunikation verursachen (Ku et al., 2011; Jordan et al., 2013; Ranft

et al., 2016). Diese EEG-Analysen sind auf die kortikale Aktivität beschränkt und können nur auf den Einfluss subkortikaler Strukturen wie des Thalamus schließen. Mithilfe der Voltage-sensitive dye imaging (VSDI)-Technik wurden die Auswirkungen von Sevofluran und Propofol auf die kortikale Depolarisation infolge einer elektrischen Stimulation im VB-Kernkomplex des Thalamus in akuten Mäusehirnschnitten untersucht (Kratzer et al., 2017). Die Exposition mit Sevofluran verminderte global die kortikale Depolarisation in einer dosisabhängigen Weise. Sevofluran verminderte die Intensität und das Ausmaß der kortikalen Depolarisation und verzögerte die thalamokortikale Signalausbreitung. Im Gegensatz dazu beeinflusste Propofol weder Fläche noch Amplitude der kortikalen Depolarisation. Allerdings führte die Propofol-Exposition zu regionalen Veränderungen in der räumlichen Verteilung der maximalen Fluoreszenzintensität in tiefen Regionen des Kortex (Kratzer et al., 2017).

Verfechter des „Top Down Mechanismus“ postulieren eine primär kortikale Beeinflussung durch Anästhetika, in dessen Folge die verminderte Aktivität im Thalamus nur sekundär entsteht. Velly et al. (2007) verglichen die dynamische Wirkung von Anästhetika auf kortikaler und subkortikaler Ebene während der Narkoseeinleitung. Die Studie zeigt, dass die Verlangsamung des kortikalen EEG vor elektrophysiologischen subkortikalen Effekten auftritt (Velly et al., 2007). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Bewusstlosigkeit hauptsächlich über kortikale Mechanismen vermittelt wird, die Unterdrückung der Bewegung als Reaktion auf schädliche Stimuli jedoch durch die Wirkung subkortikaler Strukturen ausgelöst wird (Velly et al., 2007). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Studien am Menschen unter Verwendung funktioneller Magnetresonanztomographie (Antognini et al., 1997) und experimenteller neurophysiologischer Daten an Ratten (Destexhe, 2000; Hentschke et al., 2005; Lukatch & MacIver, 1996). Den ersten in Vitro-Nachweis, dass Anästhetika die kortikale Oszillationsaktivität unabhängig von der subkortikalen Struktur verlangsamen, lieferten Lukatch et al. unter Verwendung von Hirnschnitten (Lukatch & MacIver, 1996). Antognini und Kollegen (1997) zeigten beim Menschen, dass eine leichte Anästhesie (0,7% Isofluran) den somatosensorischen Kortex unterdrückt, nicht aber die thalamische Reaktion auf schmerzhafte Stimulation. Daher deuten die experimentellen Daten auf eine vorherrschende Wirkung von Anästhetika auf den Kortex bei niedrigen Konzentrationen hin, was

mit den Beobachtungen von Velly et al. (2007) im frühen Stadium der Anästhesieeinleitung übereinstimmt.

Es konnte also für einige Anästhetika ein direkter Effekt auf die kortikale Exzitation gezeigt werden (Velly et al., 2007; Hentschke et al., 2005). Ketamin scheint kortikale Neurone zumindest nicht direkt zu beeinflussen. Somit wäre die verstärkte kortikale Aktivität im EEG durch eine veränderte synaptische Transmission, also eine Disinhibition oder gesteigerte Exzitation erklärbar.

## **6. Die Wirkung von S-Ketamin auf spontane GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme**

Vorausgegangene Untersuchungen haben die Wirkung von Anästhetika auf Neurone im Hirnstamm, in der Großhirnrinde und im Thalamus identifiziert (Ferrarelli et al., 2012; Purdon et al., 2009).

Neben einer Modulation der zellulären Erregbarkeit konnte für viele Anästhetika eine Modulation der synaptischen Transmission gezeigt werden. Das Injektionsanästhetikum Propofol scheint hauptsächlich die inhibitorische GABAerge synaptische Transmission zu verstärken (Peduto et al., 1991), wohingegen volatile Anästhetika zusätzlich die exzitatorische glutamaterge synaptische Transmission hemmen (MacIver et al., 1996). Das Inhalationsanästhetikum Xenon scheint vorrangig die exzitatorische Transmission zu vermindern (Haseneder et al., 2008). In der Konsequenz führen die Anästhetika aber alle zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Exzitation und Inhibition in Richtung der Inhibition. Da Ketamin die kortikale neuronale Aktivität jedoch steigert, scheint hier ein anderer Mechanismus ursächlich zu sein. In der Literatur wurde bisher als Hauptmechanismus für Ketamin ein NMDA-Antagonismus postuliert (Trimmel et al., 2018; Peltoniemi et al., 2016). Dieser erklärt allerdings nicht die im EEG zu beobachtende Aktivitätssteigerung. Es wurde postuliert, dass Ketamin als Offenkanalblocker NMDA-Rezeptoren auf den Neuronen antagonisiert, die am aktivsten sind (Purdon et al., 2015). Ein Mechanismus der Disinhibition wurde deshalb diskutiert, weil Interneurone zu den aktivsten Neuronen zählen (Olney & Farber, 1995; Seamans, 2008). Die erhöhte Aktivität wäre folglich auf eine bevorzugte Hemmung der NMDA-Rezeptoren, die auf GABAergen Interneuronen exprimiert werden,

zurückzuführen (Zanos & Gould, 2018). In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Ketamin über verminderte spontane GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte postsynaptische Ströme, und somit einer Disinhibition des Kortex, zur dissoziativen Anästhesie mit neuronaler Aktivitätssteigerung führt. Dies konnte jedoch durch die Aufzeichnung von sIPSCs nach Applikation von 10 µM S-Ketamin nicht bestätigt werden. S-Ketamin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Amplitude, Frequenz, Deaktivierungszeitkonstante oder Fläche unter der Kurve. Somit wurde ein Wirkmechanismus von S-Ketamin über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren nicht bestätigt.

Die meisten anderen Anästhetika erhöhen die Aktivität der hemmenden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die entsprechend der Lokalität ihrer Expression in zwei Hauptgruppen unterteilt sind: postsynaptisch und extrasynaptisch (Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012). Postsynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden durch hohe Konzentrationen des Neurotransmitters GABA aktiviert, die von präsynaptischen Terminalen freigesetzt werden. Eine Erhöhung der Membranpermeabilität für Chlorid und Bikarbonationen durch die Bindung von GABA, führt zu einem Netto-Einwärtsfluss von Anionen und einer hyperpolarisierenden postsynaptischen Reaktion: dem inhibitorischen postsynaptischen Potential (Farrant & Nusser, 2005). Diese Rezeptoren erzeugen transiente hemmende postsynaptische Ströme, die die schnelle Kommunikation zwischen Neuronen regeln und als phasische Hemmung bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu werden extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch niedrige Umgebungskonzentrationen von GABA aktiviert und erzeugen einen tonischen hemmenden Strom, der die neuronale Erregbarkeit, die Netzwerksynchronität und das kognitive Verhalten reguliert (Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012). Im Zusammenhang mit der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelten Inhibition spielt auch die Untereinheitenzusammensetzung eine entscheidende Rolle (Speigel et al., 2017). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die eine  $\gamma 2$ -Untereinheit in Verbindung mit  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - oder  $\alpha 3$ - Untereinheit enthalten sind die vorherrschenden Rezeptor Subtypen, welche die phasische Inhibition vermitteln (Farrant & Nusser, 2005). Rezeptoren, die  $\alpha 4$ -,  $\alpha 5$ - oder  $\alpha 6$ -Untereinheiten enthalten sind überwiegend oder ausschließlich extrasynaptisch lokalisiert und vermitteln die tonische Inhibition. Dabei können extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren grob nach Vorhandensein oder Fehlen der  $\delta$ - Untereinheit eingeteilt werden (Mortensen & Smart, 2006). Die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt nicht nur die Eigenschaften der

Rezeptoren, sondern auch ihre Verteilung auf der Zelloberfläche und ihre dynamische Regulation (Luscher & Keller, 2004; Sieghart & Sperk, 2002; Hevers & Luddens, 1998).

Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass hohe Konzentrationen von Ketamin inhibitorische GABA-Rezeptor abhängige postsynaptische Ströme in Neuronen von olfaktorischen kortikalen Schnitten von Meerschweinchen (300  $\mu\text{M}$ ; Scholfield, 1980) und von Hippocampusschnitten von Ratten (500  $\mu\text{M}$ ; Gage & Robertson, 1985) verstärken. Darüber hinaus deuten Hirnbildgebungsstudien am Menschen darauf hin, dass S-Ketamin die Funktion der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im präfrontalen Kortex erhöht (Heinzel et al., 2008). Die Relevanz dieser Wirkung bleibt weiterhin umstritten, da die Konzentration zur Modifikation der Rezeptoren die klinischen angewendeten Konzentrationen bei weitem übersteigt. Im Gegensatz dazu fanden Tang & Schroeder (1973) und Brockmeyer & Kendig (1995) heraus, dass Ketamin zu keiner Abschwächung GABA-erger synaptischer Transmission führte. Vielmehr wird Ketamin als ein Beispiel für ein Anästhetikum gehandelt, das seinen Wirkmechanismus relativ spezifisch über den glutamatergen NMDA- Rezeptor entfaltet, obwohl die Wirkung auf andere Ionenkanäle nicht ausgeschlossen werden kann (Brockmeyer & Kendig, 1995). Ob Ketamin in klinisch relevanten Konzentrationen die hemmende Neurotransmission erhöht, die durch verschiedene Subtypen von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt wird, bleibt umstritten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von S-Ketamin auf die phasische Hemmung untersucht, wohingegen Wang et al. (2017) die Wirkung von Ketamin auf die phasische und tonische Hemmung in hippocampalen und kortikalen Neuronen untersuchten. Sie beobachteten eine Steigerung der Aktivität extrasynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im Hippocampus und Kortex mit minimalen Effekten auf synaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. In Analogie zu den Ergebnissen dieses Promotionsvorhabens wurde in ihrer Arbeit kein Effekt von Ketamin auf die Amplitude und Frequenz von miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) gesehen. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde unter der Zugabe von Tetrodotoxin (TTX) gemessen, um spontane Na<sup>+</sup>-abhängige Aktionspotentiale zu blockieren. Selbst in hohen Dosen von 300  $\mu\text{M}$  Ketamin kam es zu keiner Modulation postsynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen. Ketamin (10 bis 1.000  $\mu\text{M}$ ) erhöhte die Amplitude des tonischen Stroms in dosisabhängiger Weise bei allen untersuchten

Konzentrationen. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind zum einen auf die deutlich höheren Konzentrationen von Ketamin zurückzuführen, zum anderen fanden die Messungen in Anwesenheit von niedrigen exogenen GABA-Konzentrationen (0,3  $\mu\text{M}$ ) statt. Die Empfindlichkeit gegenüber niedrigen Konzentrationen von GABA deutet darauf hin, dass Ketamin die Aktivität hochaffiner extrasynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren erhöht, welche einen tonischen inhibitorischen Strom erzeugen (Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012). So scheinen extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine größere Affinität für GABA zu besitzen und sind im Vergleich zu postsynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren empfindlicher gegenüber Ketamin (Wang et al., 2017). Die  $\alpha 4\beta\delta$ -Rezeptoren stellen die wichtigsten extrasynaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in den meisten Hirnregionen dar, insbesondere im Vorderhirn, wobei  $\alpha 6\beta\delta$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren die vorherrschenden extrasynaptischen Rezeptoren im Kleinhirn sind und  $\alpha 5\beta\gamma 2$ - und  $\alpha 1\beta\delta$ -Rezeptoren wichtige Mediatoren der tonischen Inhibition in hippocampalen und neokortikalen Pyramidenzellen bzw. Interneuronen darstellen (Olsen & Sieghart, 2008; Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012; Glykys et al., 2007). Die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Ketamin könnte mit der verschiedenen Untereinheitenzusammensetzung erklärt werden. Extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im Hippocampus und Kortex stellen somit plausible Zielstrukturen zur Vermittlung der neurodepressiven Eigenschaften von Ketamin dar. Der erzeugte tonische Strom reguliert im starken Maße neuronale Erregbarkeit, synaptische Plastizität und Kognition (Brickley & Mody, 2012). Tatsächlich wurde der Beitrag der tonischen Hemmung zur gesamten inhibitorischen Leitfähigkeit als mindestens dreimal größer als der der phasischen Hemmung geschätzt (Bai et al., 2001). Anästhetika, die bevorzugt den tonischen Strom erhöhen, verursachen typischerweise eine tiefgreifende Neurodepression (Farrant & Nusser, 2005; Brickley & Mody, 2012). So führt der erhöhte extrasynaptisch vermittelte GABA<sub>A</sub>-Strom durch Ketamin wahrscheinlich zu neurodepressiven Eigenschaften wie Gedächtnisverlust und Sedierung (Wang et al., 2017).

In der Arbeit von Yuan et al. (2016) konnte für Ketamin ein inhibitorischer Effekt auf spontane exzitatorische postsynaptische Ströme (sEPSC) in Pyramidenzellen der Lamina IV demonstriert werden. Insgesamt wurden in dieser Arbeit jedoch deutlich höhere Konzentrationen (30 – 1000  $\mu\text{M}$ ) von Ketamin verwendet, sodass die klinische Relevanz der Untersuchungen fraglich ist. Eine relevante



Beobachtung wurde insofern gemacht, als dass die Frequenz und Amplitude von sEPSCs in einem konzentrationsabhängigen Reduktionsmuster verringert wurden. Die Autoren vermuten, dass diese Hemmung durch eine Verringerung der Sensitivität der postsynaptischen glutamatergen Rezeptoren vermittelt worden ist (Yuan et al., 2016). Ihre Ergebnisse liefern erneut den Hinweis, dass die postsynaptischen glutamatergen Rezeptoren der Neurone im primären somatosensorischen Kortex eine Rolle für den Wirkungsmechanismus von Ketamin spielen.

In Übereinstimmung mit diesen Annahmen steht die Arbeit von Fu et al. (2017), die die Wirkung von Ketamin (30-1000  $\mu\text{M}$ ) auf die glutamaterge Neurotransmission im ventralen posteromedialen Nukleus (VPM) des Thalamus von Ratten untersuchten. Eine verminderte Amplitude (30-1000  $\mu\text{M}$ ) der sEPSCs und verminderte Frequenz in hohen Konzentrationen (300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ) konnte auch hier gezeigt werden. Die Frequenz der mEPSCs wurde unter Ketamin nicht verändert, jedoch verminderte Ketamin (100-1000  $\mu\text{M}$ ) die Amplitude der mEPSCs. Die Frequenz der mEPSCs wird als Maß für die präsynaptische Aktivität und die Amplitude als Maß für postsynaptische Effekte angesehen (Banks & Pearce, 1999). Die verminderte glutamaterge Neurotransmission im VPM scheint folglich hauptsächlich auf einem postsynaptischen Mechanismus zu beruhen (Fu et al., 2017). Ketamin verminderte jedoch die Frequenz und Amplitude der sEPSCs in Abwesenheit von TTX. TTX wurde zur Verhinderung der synaptischen Kommunikation zwischen VPM-Neuronen verwendet. Es scheint also, dass die glutamaterge synaptische Transmission an der Ketamin-induzierten Unterdrückung der glutamatergen Neurotransmission bei der VPM beteiligt ist (Fu et al., 2017). Die präsynaptische Freisetzung von Glutamat moduliert die exzitatorische Neurotransmission durch NMDA- und AMPA-Rezeptoren (McBain & Mayer, 1994). Ketamin verringerte auch in Trigeminalsinneszellen die Amplitude der evozierten EPSCs (Wang et al., 2011), was in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Fu et al. (2017) steht. Als Offenkanalblocker von NMDA-Rezeptoren dämpft Ketamin wahrscheinlich die glutamaterge Neurotransmission durch eine Inhibition der postsynaptischen NMDA-Rezeptoren in VPM-Neuronen (Fu et al., 2017). Im Vergleich zu den Kontrollen erholten sich die Ströme von sEPSCs und mEPSCs nicht vollständig auf den Ausgangswert. Dies könnte mit der Neurotoxizität der eingesetzten hohen Ketaminkonzentrationen zusammenhängen (Shibuta et al., 2015).



In der vorliegenden Arbeit konnte die postulierte Disinhibition nicht bestätigt werden, da die sIPSCs unverändert blieben. Es wurden schon vielfältige Wirkungen von Ketamin an glutamatergen Rezeptoren gezeigt (Trimmel et al., 2018; Peltoniemi et al., 2016). Insofern ist davon auszugehen, dass die erhöhte kortikale Aktivität im EEG auf einem agonistischen Effekt der schnellen glutamatergen synaptischen Übertragung beruht.

## **7. Neue Indikationen und Anwendungsregeln für Ketamin**

Die Ergründung der genauen molekularen Zielstrukturen und Wirkungsweisen von Ketamin stellt ein hochaktuelles und wichtiges Thema der heutigen Forschung dar. Zu den häufigsten Nebenwirkungen einer Ketamin basierten Anästhesie zählt das postoperative Delir. Obwohl hierfür die genauen molekularen Wirkmechanismen nicht vollständig geklärt sind und es sich wahrscheinlich auch um ein multifaktorielles Geschehen handelt, so ließen sich pharmakologische Strategien zur Verbesserung der postoperativen kognitiven Dysfunktionen entwickeln, wenn die genauen Wirkmechanismen der Anästhetika bekannt wären.

In letzter Zeit hat Ketamin zunehmend an Popularität als Antidepressivum sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin erfahren. Da Angststörungen bei Hunden auffällige Ähnlichkeiten zu menschlichen Stimmungsstörungen aufweisen (Vermeire et al., 2009; Deckersbach et al., 2006; Rogers et al., 2004), könnte Ketamin auch eine wertvolle Alternative zur Behandlung bestimmter Verhaltensstörungen bei Hunden sein. Hirnbildgebungsstudien haben über ähnliche Anomalien im regionalen zerebralen Blutfluss bestimmter Hirnregionen bei Hunden mit angstassozierten Verhaltensstörungen und bei Menschen, die an Depressionen und Angststörungen leiden, berichtet (Vermeire et al., 2009; Eren et al., 2003; Etkin & Wagner, 2007; Fitzgerald et al., 2008). Darüber hinaus wurde sowohl bei Menschen als auch bei Hunden eine veränderte Durchblutung dieser Hirnregionen nach intravenöser subanästhetischer Applikation von Ketamin nachgewiesen (Rowland et al., 2010; Holcomb et al., 2001 & 2005; Pollak et al., 2015; Waelbers et al., 2015; Vlerick et al., 2018 & 2019). Studien zur funktionellen Bildgebung haben außerdem eine veränderte Funktion des serotonergen Systems in mehreren kortikalen Hirnregionen erwiesen, die bei Menschen mit Stimmungs- und Angststörungen und bei Hunden mit Verhaltensstörungen assoziiert sind (Vermeire et al., 2009; Mintun et al., 2004;

Yatham et al., 2000). Da das Management von Verhaltensstörungen bei Hunden eine Herausforderung darstellt, und die Behandlungsergebnisse oft unbefriedigend sind, besteht ein Bedarf an schnelleren und wirksameren Behandlungsstrategien (Beata et al., 2007; Sherman & Mills, 2008; Landsberg et al., 2008; Takeuchi et al., 2000). Die genauen Wirkmechanismen zu kennen stellt also folglich eine wichtige Grundlage für eine wirkungsvolle und sichere Anwendung von Ketamin als Anästhetikum oder Therapeutikum bei Angst- und Verhaltensstörungen dar.

Unsere Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass die neuronale Aktivitätssteigerung über einen Agonismus der exzitatorischen Neurotransmission zustande kommt. Möglicher Wirkmechanismus wäre ein AMPA-Rezeptor Agonismus. AMPA-Rezeptoren sind ionotrope transmembranale glutamaterge Rezeptoren, die hauptsächlich für die Transduktion der schnellen synaptischen Neurotransmission im Gehirn verantwortlich sind (Derkach et al., 2007). Eine maßgebliche Vermittlung der antidepressiven Eigenschaften des Ketamins über AMPA-Rezeptoren wird in der Literatur derzeit stark postuliert (Aleksandrova et al., 2017; Zanos & Gould, 2018). Tatsächlich ist die Aktivierung sowohl der AMPA-Rezeptoren als auch der NMDA-Rezeptoren für die synaptische Potenzierung und die synaptische Plastizität erforderlich, die beide vermutlich an den antidepressiven Wirkungen von Ketamin beteiligt sind (Citri & Malenka, 2008). Quantitative EEG-Messungen beim Menschen (Sanacora et al., 2014) sowie bei Ratten (Kocsis, 2012) zeigten ketamininduzierte Erhöhungen der Gamma-Band-Power, was neben der vermuteten kortikalen Disinhibierung auch auf die Aktivierung schneller ionotroper Rezeptoren, einschließlich der AMPA-Rezeptoren hinweist (Whittington et al., 2000; Cunningham et al., 2003; Muthukumaraswamy et al., 2015).

## **8. Limitationen der Studie**

Nach der Pionierarbeit von Henry McIlwain in den frühen 50er und 60er Jahren hat sich das akute Hirnschnittpräparat zu einem akzeptierten und leistungsfähigen experimentellen Ansatz im Bereich der Neurowissenschaften entwickelt (McIlwain et al., 1951; Yamamoto & McIlwain, 1966; Collingridge, 1995). Tatsächlich stammt ein Großteil unseres Verständnisses der neuronalen Funktion auf zellulärer und synaptischer Ebene aus diesem Ansatz. Akute Hirnschnittpräparate sind die mit am häufigsten verwendeten experimentellen Präparate in den Neurowissenschaften. Sie werden eingesetzt, um Fragen aus dem

gesamten Spektrum der Neurowissenschaften zu untersuchen, einschließlich der Immunhistochemie, der Hirnanatomie, biomolekularer und pharmakologischer Studien zur Untersuchung von Kanalopathien und elektrophysiologischer Studien zur Charakterisierung der Eigenschaften einzelner Neuronen und Synapsen sowie glialer und neuronaler Netzwerke (Colbert, 2006; Khurana & Li, 2013; Buskila et al., 2007, Buskila & Amitai, 2010). Eine der größten Einschränkungen ist die Lebensdauer eines Hirnschnittes. Normalerweise beträgt die Lebensdauer des Hirnschnittes einer Ratte oder Maus 6-12 Stunden (Buskila et al., 2014). Jedoch hat sich gezeigt, dass die überwiegende Mehrheit der Zellen in hippocampalen und neokortikalen Schnitten nur für 4 Stunden einen vitalen Zustand aufweist (Fukuda et al., 1995). Veränderungen des pH-Wertes, der Temperatur, des Sauerstoff- und Glukosespiegels zählen zu äußeren Einflüssen, die zur Verminderung der Schnittqualität führen können (Schurr et al., 1985; Reid et al., 1988; Dingledine et al., 1980). Da die Schnitte in der Regel in einer unsterilen Umgebung verarbeitet werden, sind sie Umwelteinflüssen und Bakterien ausgesetzt, welche durch das mögliche Freisetzen von Endotoxinen zu Neurodegeneration führen und das Überleben der Neurone beeinflussen können (Qin et al., 2007; Ahmed et al., 2000). Auch Gewebeerstörung als sekundäre Folge einer durch den Schneidevorgang verursachten Verletzung führt zur Reduktion der Lebensdauer eines Schnittes. Toxische Substanzen wie exzitatorische Aminosäuren, die während des Schneidevorgangs aus den geschädigten und toten Zellen freigesetzt werden, führen zu Exzitotoxizität und neuronaler Verwundbarkeit (Schurr et al., 1995). Alle in dieser Arbeit erhobenen Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Dabei könnten Effekte kaschiert werden, die nur bei Körpertemperatur feststellbar wären (Franks & Lieb, 1996). Die Durchführung bei niedrigeren Temperaturen ist jedoch aufgrund der Hypoxietoleranz notwendig. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Stammes C57B16/N im Alter von 4- 5 Wochen verwendet. Es wurden aus den folgend dargestellten Gründen jüngere Tiere eingesetzt. Die Präparation ist aufgrund des weicheren Schädels leichter und schneller, weshalb das kleinere Gehirn jüngerer Tiere schneller abkühlt und zusätzlich die neuronalen Strukturen resistenter gegenüber Hypoxie sind (Edwards & Konnerth, 1992). Somit wurde ein besseres Überleben der Hirnschnitte jüngerer Tiere beschrieben (Lipton et al., 1995).

Ein möglicher Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mäusen auf die Ergebnisse ist eine Limitation dieser Studie. Es konnten jedoch keine Geschlechterunterschiede auf die elektrophysiologischen Eigenschaften und den exzitatorischen synaptischen Input auf mittelgroße dornentragende Projektionsneurone des Nucleus accumbens nachgewiesen werden (Willett et al., 2016). Auch Gao et al. (2018) stellten keine Geschlechterunterschiede bei Propofol- oder Ketamin-induzierter Anästhesie in jungen Mäusen fest. In einer weiteren Studie, wurde jedoch über Geschlechterunterschiede in der Wirkung von Natrium Pentobarbital-Anästhesie nach Einleitung mit Isofluran in Ratten berichtet (Zambricki & Dalecy, 2004). Weibliche Mäuse wurden aufgrund des einfacheren Handlings bezüglich der Gruppenverträglichkeit verwendet.

Weiterhin können altersbedingte Veränderungen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. So konnte eine deutlich verminderte HCN2-Kanal Expression in 35 Tagen alten Mäusen im Gegensatz zu 21 Tagen alten Mäusen nachgewiesen werden (Gao et al., 2018). Eine Beeinflussung unserer Messungen ist jedoch aufgrund der Ergebnisse am HCN-Kanal unwahrscheinlich. Entsprechend der Natur experimenteller Untersuchungen, insbesondere bei Messungen mittels der Patch-Clamp-Technik, zeigten sich trotz ständiger Kontrolle der Messbedingungen während des Experiments zum Teil erhebliche Streuungen der Messergebnisse. Diese könnten mögliche Effekte des S-Ketamins maskieren. Da bei Patch-Clamp Messungen Ströme im Picoampere ( $10^{-12}$  Ampere) -Bereich gemessen werden, die sehr sensibel auf jegliche Veränderung des Settings, der Umgebung und der Präparation reagieren, führen kleinste Veränderungen dieser zu Variationen in den Messergebnissen. Alternative Methoden zur Messung von Ionenströmen über Zellmembranen sind darüber hinaus derzeit nicht etabliert.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ketamin stellt, gerade in der Tiermedizin, eines der wichtigsten und am meisten verwendeten Anästhetika dar. Trotz der etablierten klinischen Anwendung sind die genauen Mechanismen, über die Ketamin den Bewusstseinsverlust induziert, nicht vollständig geklärt. Wiederholt wird der pharmakologischen Modulation des thalamokortikalen Netzwerks eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Eine Verminderung der neuronalen Aktivität des Thalamus konnte bislang für viele Anästhetika gezeigt werden. Ketamin scheint bezüglich seiner Wirkung auf das neuronale Netzwerk eine Sonderstellung einzunehmen. Es erzeugt klinisch den Zustand der dissoziativen Anästhesie, hemmt scheinbar selektiv die erregende synaptische Transmission über einen Antagonismus des NMDA-Rezeptors und führt zu einer Aktivierung neuronaler Oszillationen im hochfrequenten Bereich.

In dieser Arbeit wurden Wirkungen von S-Ketamin untersucht, die durch eine Modulation von HCN-Kanälen hervorgerufen werden. So führte S-Ketamin dosisabhängig zu einer Verminderung des durch HCN-Kanäle vermittelten Voltage Sags sowie zu einer Verlängerung des Rebound Burst Delays. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin zu einer signifikanten, aber quantitativ geringen Verschiebung von  $V_{(1/2)}$  in Richtung Hyperpolarisation kommt. Andererseits führt S-Ketamin ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  S-Ketamin zu einer signifikanten und dosisabhängigen Abnahme der maximalen  $I_h$ -Amplitude, was die bekannte neuronale Aktivitätssteigerung durch Ketamin allerdings nicht erklärt.

Die in der funktionellen Bildgebung gezeigte Aktivitätssteigerung im Thalamus wäre folglich die Konsequenz einer primären gesteigerten Erregbarkeit kortikaler Neurone mit nachfolgender thalamischer Aktivierung über kortikothalamische Neurone. Eine direkte Beeinflussung kortikaler Neurone der Lamina IV durch S-Ketamin wird in dieser Arbeit nicht bestätigt. Somit wäre die verstärkte kortikale Aktivität im EEG durch eine veränderte synaptische Transmission, also eine Disinhibition oder gesteigerte Exzitation erklärbar. Im nächsten Schritt wurden deshalb sIPSCs kortikaler Neurone der Lamina IV untersucht. Die in der Literatur postulierte Disinhibition konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, da S-Ketamin zu keiner signifikanten Veränderung der sIPSCs führte. Es wurden schon vielfältige Wirkungen von Ketamin an glutamatergen Rezeptoren gezeigt.

Insofern ist davon auszugehen, dass die erhöhte kortikale Aktivität im EEG einem agonistischen Effekt der schnellen glutamatergen synaptischen Übertragung zugrunde liegt.

## VII. SUMMARY

Ketamine is one of the most important and most frequently used anesthetic, especially in veterinary medicine. Despite its established clinical use, the exact mechanisms by which ketamine induces loss of consciousness are not fully understood. Repeatedly, pharmacological modulation of the thalamocortical network is attributed an important role. A reduction in the neuronal activity of the thalamus has been shown for many anesthetics except ketamine. Ketamine seems to have a special position regarding its effect on the neuronal network. It clinically induces the state of dissociative anesthesia, with selective inhibition of the excitatory synaptic transmission via an antagonism of the NMDA receptor. This leads to an activation of neuronal oscillations in the high-frequency range.

In this project some effects of S-ketamine could be shown, which are caused by a modulation of HCN channels and thus contribute to a reduced excitability of TC-relay neurons. Thus, S-ketamine led to a dose-dependent reduction of the voltage sags mediated by HCN channels as well as to an extension of the rebound burst delay. In addition, it could be shown that a dose dependent concentration of 30  $\mu\text{M}$  S-ketamine caused a significant but quantitatively small shift of  $V_{(1/2)}$  in the direction of hyperpolarization, and a significant and dose-dependent decrease in the maximum  $I_h$  amplitude. However, this does not explain the increased gamma oscillations associated with Ketamine. Therefore, the increase in thalamic activity shown in functional imaging would be the consequence of a primary increased excitability of cortical neurons with secondary thalamic activation via corticothalamic neurons. However, a direct influence of S-ketamine on cortical neurons of the lamina IV could not be shown in this study. Thus, the increased cortical activity in the EEG could be explained by an altered synaptic transmission, i.e. disinhibition or increased excitation. Therefore, in the next step sIPSCs of cortical neurons of the lamina IV were investigated. However, the disinhibition postulated in the literature could not be confirmed in this study, since S-ketamine did not lead to a significant change in sIPSCs. Various effects of ketamine on glutamatergic receptors have been shown. In this respect, it can be assumed that the increased cortical activity in the EEG underlies an agonistic effect of rapid glutamatergic synaptic transmission.





## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Agmon A, Connors BW. (1991): Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience*, 41: 365-79

Ahmed, S.-H. et al. (2000): Effects of Lipopolysaccharide Priming on Acute Ischemic Brain Injury Editorial Comment. *Stroke*, 31: 193-199

Aleksandrova LR, Phillips AG, Wang YT. (2017): Antidepressant effects of ketamine and the roles of AMPA glutamate receptors and other mechanisms beyond NMDA receptor antagonism. *J Psychiatry Neuroscience*, 42: 222-229

Alkire MT, Haier RJ, Fallon JH. (2000): Toward a unified theory of narcosis: brain imaging evidence for a thalamocortical switch as the neurophysiologic basis of anesthetic-induced unconsciousness. *Conscious Cogn*, 9: 370-86

Alkire MT, Haier RJ, Shah NK, Anderson CT. (1997): Positron emission tomography study of regional cerebral metabolism in humans during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology*, 86: 549-557

Alkire MT, Pomfrett CJ, Haier RJ, Gianzero MV, Chan CM, Jacobsen BP, Fallon JH. (1999): Functional brain imaging during anesthesia in humans: effects of halothane on global and regional cerebral glucose metabolism. *Anesthesiology*, 90: 701-709

Alkire MT, Hudetz AG, Tononi G. (2008): Consciousness and anesthesia. *Science (New York, N.Y.)* 322: 876-880

Alkire MT, Miller J. (2005): General anesthesia and the neural correlates of consciousness. *Progress in brain research*, 150: 229-244

Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D. (1983): The dissociative anesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *British journal of pharmacology*, 79: 565-575

Antognini JF, Buonocore MH, Disbrow EA, Carstens E. (1997): Isoflurane anesthesia blunts cerebral responses to noxious and innocuous stimuli: A fMRI study. *Life Sci*, 61:349-54

Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM. (2011): NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, 475:91-95

Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, MacDonald JF, Orser BA. (2001): Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol*, 59:814-24

Banks MI, Pearce RA. (1999): Dual actions of volatile anesthetics on GABA(a) IPSCs: dissociation of blocking and prolonging effects. *Anesthesiology*, 90: 120-34

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G. et al. (1998): International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological Reviews*, 50: 291-313

Beata C, Beaumont-Graff E, Diaz C, Marion M, Massal N, Marlois N, et al. (2007): Effects of alpha-casozepine (Zylkene) versus selegiline hydrochloride (Selgian, Anipryl) on anxiety disorders in dogs. *J Vet Behav Clin Appl Res*, 2: 175-83

Beaumont V, Zucker RS. (2000): Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic Ih channels. *Nat Neurosci*, 3:133-41

Beneyto M, Meador-Woodruff JH. (2004): Expression of transcripts encoding AMPA receptor subunits and associated postsynaptic proteins in the macaque brain. *J Comp Neurol*. 468: 530-554

Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. (2009): Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological Reviews* 89: 847-885

Blanton MG, Lo Turco JJ, Kriegstein AR. (1989): Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *Journal of neuroscience methods*, 30: 203-210.

Bloom FE, Iversen LL. (1971): Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature*, 229: 628-630

Bonhomme V, Fiset P, Meuret P, Backman S, Plourde G, Paus T, Bushnell MC, Evans AC. (2001): Propofol anesthesia and cerebral blood flow changes elicited by vibrotactile stimulation: A positron emission tomography study. *J Neurophysiol*, 85:1299-308

Bowery NG. (2006): GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Current opinion in pharmacology*, 6: 37-43

Brennan GP, Baram TZ, Poolos NP. (2016): Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6: a022384

Brickley SG, Mody I. (2012): Extrasynaptic GABA(A) receptors: Their function in the CNS and implications for disease. *Neuron*, 73:23-34

Brockmeyer DM, Kendig JJ. (1995): Selective effects of ketamine on amino acid - mediated pathways in neonatal rat spinal cord. *Br J Anaesth*, 74:79-84

Brown EN, Lydic R, Schiff ND. (2010): General anesthesia, sleep, and coma. *N Engl J Med*, 363:2638-50

Brown EN, Purdon PL, Van Dort CJ. (2011): General anesthesia and altered states of arousal: A systems neuroscience analysis. *Annu Rev Neurosci*, 34:601-28

Budde T, Coulon P, Pawlowski M, Meuth P, Kanyshkova T, Japes A, Meuth SG, Pape HC. (2008): Reciprocal modulation of I (h) and I (TASK) in thalamocortical relay neurons by halothane. *Pflugers Arch*, 456: 1061-73

Buskila Y, Amitai Y. (2010): Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex. *J Neurophysiol*, 103: 1322-1328

Buskila Y, Abu-Ghanem Y, Levi Y, Moran A, Grauer E, Amitai Y. (2007): Enhanced Astrocytic Nitric Oxide Production and Neuronal Modifications in the Neocortex of a NOS2 Mutant Mouse. *PLoS One* 2, 9: e848

Buskila Y, Breen PP, Tapson J, van Schaik A, Barton M, Morley JW. (2014): Extending the viability of acute brain slices. *Sci Rep*, 4: 5309

Campagna JA, Miller KW, Forman SA. (2003): Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *The New England Journal of medicine*, 348: 2110-2124

Casoni D, Spadavecchia C, Adami C. (2015): S-ketamine versus racemic ketamine in dogs: their relative potency as induction agents. *Vet Anaesth Analg*, 42:250-9

Cavazzuti M, Porro CA, Biral GP, Benassi C, Barbieri GC. (1987): Ketamine effects on local cerebral blood flow and metabolism in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 7: 806-11

Chen G, Ensor CR, and Bohner B. (1966): The neuropharmacology of 2-(omicron-chlorophenyl)- 2-methylaminocyclohexanoe hydrochloride. *J Pharmacol Exp Ther*, 152: 332-339

Chen PE, Wyllie D. (2006): Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *British journal of pharmacology*, 147: 839-853

Chen X, Shu S, Bayliss DA. (2009): HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29: 600-609

Citri A, Malenka RC. (2008): Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33:18-41

Clements JD, Westbrook GL. (1991): Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron*, 7: 605-613

Cohen ML, Chan SL, Way WL, and Trevor AJ (1973): Distribution in the brain and metabolism of ketamine in the rat after intravenous administration. *Anesthesiology*, 39: 370-376

Colbert CM. (2006): Preparation of cortical brain slices for electrophysiological recording. *Methods Mol Biol*, 337: 117-25

Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT. (2004): Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 5: 952-962

Collingridge GL. (1995): The brain slice preparation: a tribute to the pioneer Henry McIlwain. *J Neurosci. Methods*, 59: 5-9

Colquhoun D, Sigworth FJ. (1983): Fitting and statistical analysis of single-channel records, in: *Single-Channel Recording*, pp. 191–263. Eds B. Sakmann, and E. Neher. Plenum Press, New York

Corssen G, Domino EF. (1966): Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581. *Anesthesia and analgesia*, 45: 29-40

Coyle CM, Laws KR. (2015): The use of ketamine as an antidepressant: a systematic review and meta-analysis. *Hum Psychopharmacol*, 30:152-63

Crandall SR, Cruikshank SJ, Connors BW. (2015): A corticothalamic switch: controlling the thalamus with dynamic synapses. *Neuron*, 86: 768-782

Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. (2006): Regulation of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol*, 16: 288-297

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. (2001): NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 11: 327-335

Cunningham MO, Davies CH, Buhl EH, Kopell N, Whittington MA. (2003): Gamma oscillations induced by kainate receptor activation in the entorhinal cortex in vitro. *J Neurosci*, 23: 9761-9769

Deckersbach T, Dougherty DD, Rauch SL. (2006): Functional Imaging of Mood and Anxiety Disorders. *J Neuroimaging*, 16: 1-10

Dehaene S, Changeux JP. (2011): Experimental and theoretical approaches to conscious processing. *Neuron*, 70: 200-227

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR. (2007): Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 8:101-113

Destexhe A. (2000): Modelling corticothalamic feedback and the gating of the thalamus by the cerebral cortex. *J Physiol Paris*, 94 :391-410

Destexhe A, Contreras D, Steriade M. (1998): Mechanisms underlying the synchronizing action of corticothalamic feedback through inhibition of thalamic relay cells. *Journal of neurophysiology*, 79: 999-1016

Dewilde KE, Levitch CF, Murrough JW, Mathew SJ, Iosifescu D V. (2015): The promise of ketamine for treatment-resistant depression: Current evidence and future directions. *Ann NY Acad Sci*, 1345: 47-58

Dingledine R, Dodd J, Kelly J. (1980): The in vitro brain slice as a useful neurophysiological preparation for intracellular recording. *J Neurosci Meth*, 2: 323-362

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. (1999): The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Rev*, 51: 7-61

Dodt HU, Zieglgansberger W. (1994): Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function. *Trends in Neurosci*, 17: 453-458

Dodt HU, Eder M, Schierloh A, Zieglgansberger W. (2002): Infrared-guided laser stimulation of neurons in brain slices. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2002 (120), p12

Doenicke A, Kugler J, Mayer M, Angster R, Hoffmann P. (1992): Ketamin-Razemat oder S- (+)-Ketamin und Midazolam. Die Einflüsse auf Vigilanz, Leistung und subjektives Befinden. *Anaesthesist*, 41: 610-618

Domino EF. (2010): Taming the ketamine tiger. 1965. *Anesthesiology*, 113: 678-684

Domino EF, Chodoff P, Corssen G. (1965): Pharmacologic effects of CI-581, A new dissociative anesthetic in man. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 6: 279-291

Drewniany E, Han J, Hancock C, Jones RL, Lim J, Nemat Gorgani N, et al. (2015): Rapid-onset antidepressant action of ketamine: Potential revolution in understanding and future pharmacologic treatment of depression. *J Clin Pharm Ther*, 40: 125-30

Du Jardin KG, Müller HK, Elfving B, Dale E, Wegener G, Sanchez C. (2016): Potential involvement of serotonergic signaling in ketamine's antidepressant actions: a critical review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 71: 27-38

Duque JC, Oleskovicz N, Guirro EC, Valadao CA, Soares VE. (2008): Relative potency of ketamine and S (+)-ketamine in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 31: 344-8

Ebert B, Mikkelsen S, Thorkildsen C, Borghjerg FM. (1997): Norketamine, the main metabolite of ketamine, is a non-competitive NMDA receptor antagonist in the rat cortex and spinal cord. *Eur J Pharmacol*, 333: 99-104

Eckle VS, Digruccio MR, Uebele VN, Renger JJ, Todorovic SM. (2012) Inhibition of T-type calcium current in rat thalamocortical neurons by isoflurane. *Neuropharmacology*, 63: 266-73

Edwards FA, Konnerth A. (1992): Patch clamping cells in sliced tissue preparations. *Methods Enzymol*, 207: 208-22

Eger E, Sonner JM. (2006): Anaesthesia defined (gentlemen, this is no humbug). Best practice & research. *Clinical Anaesthesiology*, 20: 23-29

Eren I, Tükel R, Polat A, Karaman R, Ünal S. (2003): Evaluation of regional cerebral blood flow changes in panic disorder with Tc99m-HMPAO SPECT. *Psychiatry Res Neuroimaging*, 123:135-43

Etkin A, Wager TD. (2007): Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am J Psychiatry*, 164: 1476-88

Fahn S, Cote LJ. (1968): Regional distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in brain of the rhesus monkey. *Journal of Neurochemi*, 15: 209-213

Farrant M, Nusser Z. (2005): Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature reviews. Neuroscience*, 6: 215-229

Feder A, Parides MK, Murrough JW, Perez AM, Morgan JE, Saxena S, Kirkwood K, Aan Het Rot M, Lapidus KA, Wan LB, Iosifescu D, Charney DS. (2014):



Efficacy of Intravenous Ketamine for Treatment of Chronic Posttraumatic Stress Disorder A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 71: 681-8

Ferrarelli F, Massimini M, Sarasso S, Casali A, Riedner BA, Angelini G, Tononi G, Pearce RA. (2010): Breakdown in cortical effective connectivity during midazolam-induced loss of consciousness. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 2681-6

Filzek U, Fischer U, Ferguson J. (2003): Intravenous anaesthesia in horses: racemic ketamine versus S-(1)-ketamine. *Pferdeheilkunde*, 19: 501-6

Fiset P, Paus T, Daloze T, Plourde G, Meuret P, Bonhomme V, Hajj-Ali N, Backman SB, Evans AC. (1999): Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: A positron emission tomographic study. *J Neurosci*, 19: 5506-13

Fitzgerald PB, Laird AR, Maller J, Daskalakis ZJ. (2008): A Meta-Analytic Study of Changes in Brain Activation in Depression. *Hum Brain Mapp*, 29: 683-95

Fond G, Loundou A, Rabu C, Macgregor A, Lançon C, Brittner M, et al. (2014): Ketamine administration in depressive disorders: A systematic review and meta-analysis. *Psychopharmacology*, 23: 3663-76

Franks NP, Lieb WR. (1978): Where do general anaesthetics act? *Nature*, 274: 339-342

Franks NP, Lieb WR. (1981): Is membrane expansion relevant to anesthesia? *Nature*, 292: 248-251

Franks NP, Lieb WR. (1996): Temperature dependence of the potency of volatile general anesthetics: implications for in vitro experiments. *Anesthesiology*, 84: 716-20

Franks NP, Honoré E (2004): The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 601-8

Franks NP. (2008): General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nature Rev Neurosci*, 9: 370-386

Freye E, Latasch L, Schmidhammer H, Portoghesi P. (1994): Interaktion von S-(+)-Ketamin mit Opiatrezeptoren. *Anaesthesist*, 43: 52-58

Fu B, Liu C, Zhang Y, Fu X, Zhang L, Yu T (2017): Ketamine attenuates the glutamatergic neurotransmission in the ventral posteromedial nucleus slices of rats. *BMC Anesthesiology*, 17: 111

Fukuda A, Czurk A, Hidal H, Muramatsu K, Nishino H. (1995): Appearance of deteriorated neurons on regionally different time tables in rat brain thin slices maintained in physiological condition. *Neurosci Lett*, 184: 13-16

Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E. (2005): Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438: 185-192

Gao J, Hu Z, Shi L, Li N, Ouyang Y, Shu S, Yao S, Chen X. (2018): HCN channels contribute to the sensitivity of intravenous anesthetics in developmental mice. *Oncotarget*, 9: 12907-12917

Gao M, Rejaei D, Liu H. (2016): Ketamine use in current clinical practice. *Acta Pharmacol Sin*, 37: 865-72

Glykys J, Peng Z, Chandra D, Homanics GE, Houser CR, Mody I. (2007): A new naturally occurring GABA<sub>A</sub> receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat Neurosci*, 10: 40-8

Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N, (2001): Potassium leak channels and the KCNK family of two-P- domain subunits. *Nat Rev Neurosci*, 2: 175-84

Gonda X. (2012): Basic pharmacology of NMDA receptors. *Current pharmaceutical design*, 18: 1558-1567

Greifenstein FE, Devault M, Yoshitake J, Gajewski JE. (1958): A study of a 1-aryl cyclo hexyl amine for anesthesia. *Anes and Anal*, 37: 283-294

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391: 85-100

Haseneder R, Kratzer S, Kochs E, Eckle VS, Zieglgänsberger W, Rammes G. (2008): Xenon reduces N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-

methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor-mediated synaptic transmission in the amygdala. *Anesthesiology*, 109: 998-1006

Heinke W, Schwarzbauer C. (2002): In vivo imaging of anaesthetic action in humans: Approaches with positron emission tomography (PET) and functional magnetic resonance imaging (fMRI). *Br J Anaesth*, 89:112-22

Heinzel A, Steinke R, Poeppel TD, Grosser O, Bogerts B, Otto H, Northoff G. (2008): S-ketamine and GABA-A-receptor interaction in humans: an exploratory study with I-123-iomazenil SPECT. *Hum Psychopharmacol*, 23: 549-54

Hentschke H, Schwarz C, Antkowiak B. (2005): Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: Strong depression of firing rates and increase of GABA receptor-mediated inhibition. *Eur J Neurosci*, 21: 93-102

Herkenham M. (1980): Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science*, 207: 532-5

Hevers W, Luddens H. (1998): The diversity of GABA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA channel subtypes. *Mol Neurobiol*, 18: 35-86

Holcomb HH, Lahti AC, Medoff DR, Cullen T, Tamminga CA. (2005): Effects of Noncompetitive NMDA Receptor Blockade on Anterior Cingulate Cerebral Blood Flow in Volunteers with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 30: 2275-82

Hollmann M, Heinemann S. (1994): Cloned glutamate receptors. *An Rev of Neurosci*, 17: 31-108

Hustveit O, Maurset A, Øye I. (1995): Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, and muscarinic receptors. *Pharmacol Toxicol*, 77: 355-359

Idvall J, Ahlgren I, Aronsen KR, and Stenberg P (1979): Ketamine infusions: pharmacokinetics and clinical effects. *Br J Anaesth*, 51:1167-1173

Jones EG. *The Thalamus*, Plenum Press, New York, 1985

Jones EG. (2002): Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences, 357: 1659-1673

Jones EG. (2009): Synchrony in the interconnected circuitry of the thalamus and cerebral cortex. Annals of the New York Academy of Sciences, 1157: 10-23

Kalkman CJ, Drummond JC, Ribberink AA. (1991): Low concentrations of isoflurane abolish motor evoked responses to transcranial electrical stimulation during nitrous oxide/opioid anesthesia in humans. Anesth Analg, 73: 410-415

Khurana S, Li WK. (2013): Baptisms of fire or death knells for acute-slice physiology in the age of ‘omics’ and light. Rev Neurosci, 24: 527-536

Kikuchi T, Wang Y, Shinbori H, Sato K, Okumura F. (1997): Effects of ketamine and pentobarbitone on acetylcholine release from the rat frontal cortex in vivo. Br J Anaesth, 79: 128-130

Kim J, Wei DS, Hoffman DA. (2005): Kv4 potassium channel sub- units control action potential repolarization and frequency- dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. J Physiol, 569: 41-57

Kleckner NW, Dingledine R. (1988): Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Science, 241: 835-837

Klepstad P, Maurset A, Moberg ER, Øye I. (1990): Evidence of a role for NMDA receptors in pain perception. Eur J Pharmacol, 187: 513-518

Kohrs R, Durieux ME. (1998): Ketamine: teaching an old drug new tricks. Anesth Analg, 87: 1186-1193

Kotani Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H. (2008): The experimental and clinical pharmacology of propofol, an anesthetic agent with neuroprotective properties. CNS Neurosci and Thera, 14: 95-106

Kratzer S, Mattusch C, Garcia PS, Schmid S, Kochs E, Rammes G, Schneider G, Kreuzer M, Haseneder R. (2017): Propofol and Sevoflurane Differentially

Modulate Cortical Depolarization following Electric Stimulation of the Ventrobasal Thalamus. *Front Comput Neurosci*, 11:109

Krnjević K, Puil E. Cellular mechanisms of general anesthesia, Chapter 40. Editor(s): E. Edward Bittar, Neville Bittar, *Principles of Medical Biology*, Elsevier, Volume 8, 1997, Pages 811-828

Kushikata T, Yoshida H, Kudo M, Kudo T, Kudo T, Hirota K. (2011): Role of coerulean noradrenergic neurones in general anaesthesia in rats. *Br J Anaesth*, 107: 924-929

Lambolez B, Ropert N, Perrais D, Rossier J, Hestrin S. (1996): Correlation between kinetics and RNA splicing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 1797-1802

Landsberg GM, Melese P, Sherman BL, Neilson JC, Zimmerman A, Clarke TP. (2008): Effectiveness of fluoxetine chewable tablets in the treatment of canine separation anxiety. *J Vet Behav Clin Appl Res*, 3:12-9

Långsjö JW, Maksimow A, Salmi E, Kaisti K, Aalto S, Oikonen V, Hinkka S, Aantaa R, Sipila H, Viljanen T, Parkkola R, Scheinin H. (2005): S-ketamine anesthesia increases cerebral blood flow in excess of the metabolic needs in humans. *Anesth*, 103: 258-268

Lankveld DP, Driessen B, Soma LR, Moate PJ, Rudy J, Uboh CE, van Dijk P, Hellebrekers LJ. (2006): Pharmacodynamic effects and pharmacokinetic profile of a long-term continuous rate infusion of racemic ketamine in healthy conscious horses. *J Vet Pharmacol Ther*, 29: 477-88

Larenza MP, Knobloch M, Landoni MF, Levionnois OL, Knobloch M, Kronen PW, Theurillat R, Schatzmann U, Thormann W. (2008): Stereoselective pharmacokinetics of ketamine and norketamine after racemic ketamine or S-ketamine administration in Shetland ponies sedated with xylazine. *Vet J*, 17: 432-5

Larenza MP, Ringer SK, Kutter AP, Conrot A, Theurillat R, Kummer M, Thormann W, Bettschart-Wolfensberger R. (2009): Evaluation of anesthesia recovery quality after low-dose racemic or S-ketamine infusions during anesthesia with isoflurane in horses. *Am J Vet Res*, 70: 710-8

Laureys S. (2005): The neural correlate of (un)awareness: lessons from the vegetative state. *Trends Cogn Sci*, 9: 556-559

Lee EE, Della Selva MP, Liu A, Himelhoch S. (2015): Ketamine as a novel treatment for major depressive disorder and bipolar depression: A systematic review and quantitative meta-analysis. *Gen Hosp Psychiatry*, 37: 178-84

Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, and Duman RS (2010): mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 329: 959-964

Lipton P, Aitken PG, Dudek FE, Eskessen K, Espanol MT, Ferchmin PA, Kelly JB, Kreisman NR, Landfield PW, Larkman PM, et al. (1995): Making the best of brain slices: comparing preparative methods. *J Neurosci Methods*, 59:151-6

Liu XB, Honda CN, Jones EG. (1995): Distribution of four types of synapse on physiologically identified relay neurons in the ventral posterior thalamic nucleus of the cat. *J Comp Neurol*, 352: 69-91

Lodge D, Anis NA, and Burton NR. (1982): Effects of optical isomers of ketamine on excitation of cat and rat spinal neurones by amino acids and acetylcholine. *Neurosci Lett*, 29: 281-286

Lu J, Nelson LE, Franks N, Maze M, Chamberlin NL, Saper CB. (2008): Role of endogenous sleep-wake and analgesic systems in anesthesia. *J Comp Neurol*, 508: 648-662

Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, Sprengel R, Seeburg PH, Nicoll RA. (2009): Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron*, 62: 254-268

Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F. (2003): Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *The EMBO J*, 22: 216-224

Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. (1999): Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *The EMBO J*, 18: 2323-2329

Lukatch HS, MacIver MB. (1996): Synaptic mechanisms of thiopental-induced alterations in synchronized cortical activity. *Anesthesiology*, 84: 1425-34

Luscher B, Keller CA. (2004): Regulation of GABA receptor A trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther*, 102: 195-221

Macdonald RL, Olsen RW. (1994): GABAA receptor channels. *Ann Rev Neuro*, 17: 569-602

MacIver MB, Mikulec AA, Amagasu SM, Monroe FA. (1996): Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiology*, 85: 823-34

Maddox VH, Godefro EF, Parcell RF. (1995): The Synthesis of Phencyclidine and other 1-Arylcyclohexylamines. *J of med chem*, 8: 230-235

Maksimow A, Särkelä M, Långsjö JW, Salmi E, Kaisti KK, Yli-Hankala A, Hinkka-Yli-Salomäki S, Scheinin H, Jääskeläinen SK. (2006): Increase in high frequency EEG activity explains the poor performance of EEG spectral entropy monitor during S-ketamine anesthesia. *Clin Neurophysiol*, 117: 1660-1668

Marietta MP, Way WL, Castagnoli N, Trevor A.J. (1977): On the pharmacology of the ketamine enantiomorphs in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 202: 157-165

Mashour GA. (2014): Top-down mechanisms of anesthetic-induced unconsciousness. *Front Syst Neurosci*, 8:115

Mashour GA (2015): Noble path to oblivion: molecular and neurophysiological mechanisms of xenon. *Anesthesiology*, 122: 971-3

Mashour GA, Hudetz AG. (2017): Bottom-Up and Top-Down Mechanisms of General Anesthetics Modulate Different Dimensions of Consciousness. *Frontiers in Neu Circ*, 11: 44

Mattusch C, Kratzer S, Buerge M, Kreuzer M, Engel T, Kopp C, Biel M, Hammelmann V, Ying SW, Goldstein PA, Kochs E, Haseneder R, Rammes G. (2015): Impact of Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated Cation Channel Type 2 for the Xenon-mediated Anesthetic Effect: Evidence from In Vitro and In Vivo Experiments. *Anesthesiology*, 122: 1047-59

McBain CJ, Mayer ML. (1994): N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev*, 74: 723-60

McCarthy DA, Chen G, Kaump DH, Ensor C. (1965): General anesthetic and other pharmacological properties of 2-(O-Chlorophenyl)-2-Methylamino Cyclohexanone HCL (CI-58L). *The Journal of New Drugs*, 5: 21-33

McCormick DA, Bal T. (1997): Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Ann Rev of Neurosci*, 20:185-215

McIlwain H, Buchel L, Cheshire JD. (1951): The inorganic phosphate and phosphocreatine of Brain especially during metabolism in vitro. *Biochem J*, 48: 12-20

Meldrum BS. (2000): Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, 130 (4S Suppl), 1007S-15S.

Mellor J, Nicoll RA, Schmitz D. (2002): Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic Ih channels. *Science*, 295: 143-7

Meuth SG, Budde T, Kanyshkova T, Broicher T, Munsch T, Pape HC. (2003): Contribution of TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons., *J Neurosci*, 23: 6460-9



Meyer H. Studien über die Narkose. Archiv. Exptl. Pathol. Pharmacol. Naunyn-Schiedeberg's 1899; 42: 109

Miller OH, Yang L, Wang CC, Hargroder EA, Zhang Y, Delpire E, and Hall BJ (2014): GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *eLife* 3: e03581

Mintun MA, Sheline YI, Moerlein SM, Vlassenko AG, Huang Y, Snyder AZ. (2004): Decreased hippocampal 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in major depressive disorder: In vivo measurement with [18F] mianserin positron emission tomography. *Biol Psychiatry*, 55: 217-24

Mion G, Villeveille T. (2013): Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). *CNS Neurosci Ther*, 19: 370-380

Moaddel R, Abdrakhmanova G, Kozak J, Jozwiak K, Toll L, Jimenez L, Rosenberg A, Tran T, Xiao Y, Zarate CA, Wainer IW. (2013): Sub-anesthetic concentrations of (R,S)- ketamine metabolites inhibit acetylcholine-evoked currents in  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, 698: 228-234

Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. (1997): Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci*, 17: 2921-7

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. (1989): The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann Rev of Pharma and Toxi*, 29: 365-402

Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. (1999): Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem*, 380: 975-80

Mortensen M, Smart TG. (2006): Extrasynaptic  $\alpha$  subunit GABA<sub>A</sub> receptors on rat hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol*, 577: 841-56

Moruzzi G, Magoun HW. (1949): Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Clin Neurophysiol*, 1: 455-473

Muir WW, Skarda RT, Milne DW. (1977): Evaluation of xylazine and ketamine hydrochloride for anesthesia in horses. *Am J Vet Res*, 38: 195-201

Muir WW. (2010): NMDA Receptor Antagonists and Pain, Ketamine. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* Volume 26, issue 3

Muthukumaraswamy SD, Shaw AD, Jackson LE, Hall J, Moran R, Saxena N. (2015): Evidence that Subanesthetic Doses of Ketamine Cause Sustained Disruptions of NMDA and AMPA-Mediated Frontoparietal Connectivity in Humans. *J Neurosci*, 35: 11694-11706

Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA. (1994): Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *Journal of Neurochem*, 62: 815-818

Neher E, Sakmann B. (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260: 799-802

Niswender CM, Conn PJ. (2010): Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50: 295-322

Olney JW, Farber NB. (1995): Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 52: 998-1007

Overton CE. (1901): Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Fischer, Jena

Oye I, Paulsen O, Maurset A. (1992): Effects of ketamine on sensory perception: evidence for a role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 260: 1209-1213

Palmer SL, Noctor SC, Jablonska B, Juliano SL. (2001): Laminar specific alterations of thalamocortical projections in organotypic cultures following layer 4 disruption in ferret somatosensory cortex. *Eur J Neurosci*, 13: 1559-71

Pape HC, McCormick DA. (1989): Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature*, 340: 715-8

Pape HC, Meuth SG, Seidenbecher T, Munsch T, Budde T. (2005): Der Thalamus: Tor zum Bewusstsein und Rhythmusgenerator im Gehirn., *Neuroforum* 2: 44-55

Pape HC. (1996): Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Ann Rev Physiol*, 58: 299-327

Parsons CG, Stoffler A, Danysz W. (2007): Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system-too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*, 53: 699-723

Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M (1999): inhalational anesthetics activate two-pore-domain background  $K^+$  channels. *Nat Neurosci*, 2: 422-6

Patel AJ, Honoré E (2001): Anesthetic-sensitive 2P domain  $K^+$  channels. *Anesthesiology*, 95: 1013-21

Parsons LE, Walmsley JP. (1982): Field use of an acetylpromazine, methadone, ketamine combination for anesthesia in the horse and donkey. *Vet Rec*, 111: 395

Peduto VA, Concas A, Santoro G, Biggio G, Gessa GL. (1991): Biochemical and electrophysiologic evidence that propofol enhances GABAergic transmission in the rat brain. *Anesthesiology*, 75: 1000-9

Peltoniemi MA, Hagelberg NM, Olkkola KT, Saari TI. (2016): Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy. *Clinical pharmacokinetics*, 55: 1059-1077

Pereda AE. (2014): Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Rev Neurosci*, 15: 250-263

Petroianu G, Osswald PM, Brunnengräber R. (1994): Klinische Pharmakologie für Anästhesisten. Chapman&Hall. Kondon, Glasbow Winheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras

Pollak TA, De Simoni S, Barimani B, Zelaya FO, Stone JM, Mehta MA. (2015): Phenomenologically distinct psychotomimetic effects of ketamine are associated with cerebral blood flow changes in functionally relevant cerebral foci: A continuous arterial spin labelling study. *Psychopharmacology*, 232: 4515-24

Poolos NP, Migliore M, Johnston D. (2002): Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci*, 5: 767-74

Postea O, Biel M. (2011): Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10: 903-914

Price RB, Iosifescu DV, Murrough JW, Chang LC, Al Jurdi RK, Iqbal SZ, et al. (2014): Effects of ketamine on explicit and implicit suicidal cognition: A randomized controlled trial in treatment-resistant depression. *Depress Anxiety*, 31: 335–43

Purdon PL, Pierce ET, Bonmassar G, WalshJ, Harrell PG, Kwo J, et al. (2009): Simultaneous electroencephalography and functional magnetic resonance imaging of general anesthesia. *Ann NY Acad Sci*, 1157: 61-70

Purdon PL, Sampson A, Pavone KJ, Brown EN. (2015): Clinical Electroencephalography for Anesthesiologists: Part I: Background and Basic Signatures. *Anesthesiology*, 123: 937-960

Qin L, Wu X, Block M, Liu Y, Breese G. (2007): Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration. *Glia*, 55: 453-462

Rajkumar R, Fam J, Yeo EYM, Dawe GS. (2015): Ketamine and suicidal ideation in depression: Jumping the gun? *Pharmacol Res*, 99: 23-35

Reid KH, Edmonds HL, Schurr A, Tseng MT, West CA. (1988): Pitfalls in the use of brain slices. *Prog Neurobiol*, 31: 1-18

Ries CR, Puil E. (1999a) Ionic mechanism of isoflurane's actions on thalamocortical neurons. *J Neurophysiol*, 81: 1802-1809

Ries CR, Puil E. (1999b): Mechanism of anesthesia revealed by shunting actions of isoflurane on thalamocortical neurons. *J Neurophysiol*, 81:1795-1801

Robinson RB, Siegelbaum SA. (2003): Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Ann Rev of Physiology*, 65: 453-480

Rogers MA, Kasai K, Koji M, Fukuda R, Iwanami A, Nakagome K, et al. (2004): Executive and prefrontal dysfunction in unipolar depression: A review of neuropsychological and imaging evidence. *Neurosci Res*, 50:1-11

Rossetti RB, Gaido Cortopassi SR, Intelizano T, Lima Machado TS, Ferreira da Cruz RS. (2008): Comparison of Ketamine and S (+) ketamine, with romifidine and diazepam for total intravenous anesthesia in horses. *Vet Anaesth Analg*, 35: 30-7

Rowland LM, Beasonheld L, Tamminga CA, Holcomb HH. (2010): The interactive effects of ketamine and nicotine on human cerebral blood flow. *Psychopharmacology (Berl)*, 208: 575-84

Rudolph U, Antkowiak B. (2004): Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci*, 5, 709-720

Ryder S, Way WT, Trevor AJ. (1978): Comparative pharmacology of the optical isomers of ketamine in mice. *Eur J Pharmacol*, 49: 15-23

Sanacora G, Smith MA, Pathak S, Su HL, Boeijinga PH, McCarthy DJ, et al. (2014): Lanicemine: a low-trapping NMDA channel blocker produces sustained antidepressant efficacy with minimal psychotomimetic adverse effects. *Mol Psychiatry*, 19: 978-985

Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, et al. (2000): Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci*, 20: 5264-75

Santoro B, Baram TZ. (2003): The multiple personalities of h-channels. Trends Neurosci, 26: 550-4

Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA et al. (1987): Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. Nature, 328: 221-227

Schurr A, Payne R, Heine M, Rigor B. (1995): Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in hippocampal slice preparation. J Neurosci Methods, 59: 129-138

Schurr A, Reid K, Tseng MA. (1985): Dual chamber for comparative studies using the brain slice preparation. Comp Biochem physiol, 82: 701-704

Seamans J. (2008): Loosing inhibition with ketamine. Nat Chem Biol, 4: 91-3

Sherman BL, Mills DS. (2008): Canine Anxieties and Phobias: An Update on Separation Anxiety and Noise Aversions. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 38: 1081-106

Sherman SM, Koch C. (1986): The control of retinogeniculate transmission in the mammalian lateral geniculate nucleus. Exp Brain Res, 63: 1-20

Shibuta S, Morita T, Kosaka J, Kamibayashi T, Fujino Y. (2015): Only extra-high dose of ketamine affects l-glutamate-induced intracellular Ca (2+) elevation and neurotoxicity. Neurosci Res, 98: 9-16

Sieghart W. (1995): Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. Pharmacological Rev, 47: 181-234

Sieghart W, Sperk G. (2002): Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. Current topics in medicinal chemistry, 2: 795-816

Sinner B, Graf BM. (2008): Ketamine. Handbook of experimental pharmacology: 313–333

Slingsby LS, Waterman-Pearson AE. (2000): The post-operative analgesic effects of ketamine after canine ovariohysterectomy- a comparison between pre- or post-operative administration. *Res Vet Sci*, 69: 147-152

Stephenson FA. (1995): The GABAA receptors. *The Biochemical journal* 310 (Pt 1),1-9

Steriade M. (1992): Basic mechanisms of sleep generation. *Neurology* 42(7 Suppl 6): 9-17; discussion 18

Steriade M. (1996): Arousal: Revisiting the reticular activating system. *Science*, 272: 225-226

Steriade M. (1997): Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance. *Cereb Cortex*, 7: 583-604

Steriade M. (2005): Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci*, 28: 317-324

Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro Dossi RC. (1990): Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10: 2541-2559

Stoelting RK. (1970) Nonbarbiturate induction drugs. In:Stoelting RK, ed.*Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice*, 3<sup>rd</sup> edn.Philadelphia:Lippincott.

Strebel S, Kaufmann M, Maitre L, Schaefer HG. (1995): Effects of ketamine on cerebral blood flow velocity in humans. Influence of pretreatment with midazolam or esmolol. *Anaesthesia*, 50: 223-8

Swanson GT, Kamboj SK, Cull-Candy SG. (1997): Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation and subunit composition. *J Neurosci*, 17: 58-69

Takeuchi Y, Houpt KA, Scarlett JM. (2000): Evaluation of treatments for separation anxiety in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 217: 342-5

Tang AH, Schroeder AL. (1973): Spinal cord depressant effects of ketamine and etoxadrol in the cat and the rat. *Anesthesiology*, 39: 37- 43

Temme L, Schepmann D, Schreiber JA, Frehland B, and Wünsch B. (2018): Comparative pharmacological study of common NMDA receptor open channel blockers regarding their affinity and functional activity toward GluN2A and GluN2B NMDA receptors. *Chem Med Chem*, 13: 446-452

Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez MJ. (2000): The role of the hyperpolarization-activated current in modulating rhythmic activity in the isolated respiratory network of mice. *Neurosci*, 15; 20: 2994-3005

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. (2010): Glutamate receptor ion channels: structure, regulation and function. *Pharmacol. Rev*, 62: 405-496

Trimmel H, Helbok R, Staudinger T, Jaksch W, Messerer B, Schochl H, Likar R. (2018): S(+)-ketamine : Current trends in emergency and intensive care medicine. *Wiener klinische Wochenschrift*, 130: 356–366

Van Horn SC, Erixsir A, Sherman SM. (2000): Relative distribution of synapses in the A-laminae of the lateral geniculate nucleus of the cat. *J Comp Neurol*, 416: 509-52

Velly LJ, Rey MF, Bruder NJ, Gouvitsos FA, Witjas T, Regis JM, Peragut JC, Gouin FM. (2007): Differential dynamic of action on cortical and subcortical structures of anesthetic agents during induction of anesthesia. *Anesthesiology*, 107: 202-12

Vermeire S, Audenaert K, Dobbeleir A, De Meester R, De Vos F, Peremans K. (2009): Evaluation of the brain 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding index in dogs with anxiety disorders, measured with <sup>123</sup>I-5I-R91150 and SPECT. *J Nucl Med*, 50: 284-9

Vermeire S, Audenaert K, Dobbeleir A, de Meester R, Vandermeulen E, Waelbers T, et al. (2009): Regional cerebral blood flow changes in dogs with anxiety disorders, measured with SPECT. *Brain Imaging Behav*, 3: 342-9



Vlerick L, Peremans K, Dockx R, Audenaert K, Baeken C, De Spiegeleer B, et al. (2018): The influence of subanaesthetic ketamine on regional cerebral blood flow in healthy dogs measured with 99mTc-HMPAO SPECT. PLoS One, 1-15

Vlerick L, Peremans K, Dockx R, Audenaert K, Baeken C, Saunders JH, et al. (2019): The long-term effects of single and repeated subanaesthetic ketamine administration on regional cerebral blood flow in healthy dogs measured with 99mTc-HMPAO SPECT. Psychiatry Res Neuroimaging, 285: 18-24

Vollenweider FX, Leenders KL, Oye I, Hell D, Angst J. (1997): Differential psychopathology and patterns of cerebral glucose utilisation produced by (S)- and (R)-ketamine in healthy volunteers using positron emission tomography (PET) Eur Neuropsychopharmacol, 7: 25-38

Waelbers T, Polis I, Vermeire S, Dobbeleir A, Eersels J, De Spiegeleer B, Audenaert K, Siegers G, Peremans K. (2013): 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the feline brain: 123I-5-I-R91150 kinetics and the influence of ketamine measured with micro-SPECT. J Nucl Med, 54:1428-33

Waelbers T, Polis I, Vermeire S, Dobbeleir A, Eersels J, De Spiegeleer B, Audenaert K, Peremans K. (2015): Effect of ketamine on the regional cerebral blood flow and binding index of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor radioligand 123I-R91150 in the canine brain. J Vet Behav Clin Appl Res, 10: 332-7

Wahl-Schott C, Biel M. (2009): HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 66: 470-494

Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. (2001): Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. Nature, 411: 805-810

Wang X, Gorini C, Sharp D, Bateman R, Mendelowitz D. (2011): Anaesthetics differentially modulate the trigeminocardiac reflex excitatory synaptic pathway in the brainstem. J Physiol, 589: 5431-42

Wang DS, Penna A, Orser BA. (2017): Ketamine Increases the Function of gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptors in Hippocampal and Cortical Neurons. *Anesthesiology*, 126: 666-677

Waterman AE, Robertson SA, Lane JG. (1987): Pharmacokinetics of intravenously administered ketamine in the horse. *Res Vet Sci*, 42: 162-6

Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, Niedzielski AS. (1996): Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci*, 16: 1982-1989

White PF, Schüttler J, Shafer A, Stanski A, Horai Y, Trevor AJ. (1985): Comparative pharmacology of the ketamine isomers. Studies in volunteers. *Gr J Anaesth*, 57: 197-203

White PF, Ham J, Way WL, Trevor AJ. (1980): Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients. *Anesthesiology*, 52: 231-239

Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA, Wafford KA. (1999): Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann NY Acad of Sci*, 868: 645-653

Whittington MA, Traub RD, Kopell N, Ermentrout B, Buhl EH. (2000): Inhibition-based rhythms: experimental and mathematical observations on network dynamics. *Int J Psychophysiol*, 38: 315-336

Wiesner H. (1998): Recent developments relevant to animal welfare for the optimization of distance immobilization. *Tierarztl Prax. Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 26: 225-33

Willett JA, Will T, Hauser CA, Dorris DM, Cao J, Meitzen J. (2016): No Evidence for Sex Differences in the Electrophysiological Properties and Excitatory Synaptic Input onto Nucleus Accumbens Shell Medium Spiny Neurons; *eNeuro*, 3: ENEURO.0147-15.2016.

Wright M. (1982): Pharmacologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine. *J Am Vet Med Asso*, 180: 1462-1471

Yamakura T, Shimoji K. (1999): Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol*, 59: 279-298

Yamamoto C, McIlwain H. (1966): Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J Neurochem*, 13: 1333-43

Yamamura T, Harada K, Okamura A, Kemmotsu O. (1990): Is the site of action of ketamine anesthesia the N-methyl-D-aspartate receptor? *Anesthesiology*, 72: 704-71

Yatham LN, Liddle PF, Shiah I-S, Scarrow G, Lam RW, Adam MJ, et al. (2000): Brain Serotonin 2 Receptors in Major Depression: A Positron Emission Tomography Study. *Arch Gen Psychiatry*, 57: 850-8

Yeung LY, Wai MS, Fan M, Mak YT, Lam WP, Li Z, Lu G, and Yew DT (2010): Hyperphosphorylated tau in the brains of mice and monkeys with long-term administration of ketamine. *Toxicol Lett*, 193:189-193

Ying SW, Abbas SY, Harrison NL, Goldstein PA. (2006): Propofol block of I(h) contributes to the suppression of neuronal excitability and rhythmic burst firing in thalamocortical neurons. *The Eur Jour Neurosci*, 23: 465-480

Ying SW, Goldstein PA. (2005): Propofol-block of SK channels in reticular thalamic neurons enhances GABAergic inhibition in relay neurons. *Journal of Neurophysiology*, 93: 1935-1948

Yuan C, Zhang Y, Zhang Y, Cao S, Wang Y, Fu B, Yu T. (2016): Effects of Ketamine on Neuronal Spontaneous Excitatory Postsynaptic Currents and Miniature Excitatory Postsynaptic Currents in the Somatosensory Cortex of Rats. *Iran Jour of Med Sci*, 41: 275-282

Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, et al. (2016): NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, 533: 481-486

Zanos P, Gould TD. (2018): Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry*, 23: 801-811

Zeilhofer HU, Swandulla D, Geisslinger G, Brune K. (1992): Differential effects of ketamine enantiomers on NMDA receptor currents in cultured neurons. *Eur J Pharmacol*, 213:155-158

Zentner J, Albrecht T, Heuser, D. (1992): Influence of halothane, enflurane, and isoflurane on motor evoked potentials. *Neurosurgery*, 31: 298-305

Zhou C, Douglas JE, Kumar NN, Shu S, Bayliss DA, Chen X. (2013): Forebrain HCN1 channels contribute to hypnotic actions of ketamine. *Anesthesiology*, 118: 785-795



## IX. ANHANG

### Verwendete Chemikalien

ATP-K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ATP-Mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ba <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CaCl <sub>2</sub> -Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CGP 55845 Hydrochlorid	Abcam plc, Cambridge, UK
D-(+) Glucose Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
GTP Na	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isofluran CP ®	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
K-Glukonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NBQX	Tocris Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Phosphokreatin-di-tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### Verwendete Materialien, Geräte und Software

Analysewaage	LA 164i, VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aufzeichnungssoftware HEKA Pulse	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland
Auswertesoftware Igor Pro 5	Igor Pro 5, Wave Metrics, Lake Oswego, USA
Auswertesoftware GraphPad Prism 7.03	GraphPad Prism 7.03, GraphPad Software, Inc., USA
Borosilikatglaskapillaren	GB150EFT-10, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland Innendurchmesser 1,17 mm, Außendurchmesser 1,5 mm
Borosilikatglaskapillaren	BF150-110-10, Sutter Instruments Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
Fluoreszenzfilter	BP 500/20, FT 515, BP 535/30, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer Z.1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Guillotine	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Irisschere zur Gehirnpräparation	14094-11, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Kamera Patch-Clamp-Messplatz	Digital Camera C11440, ORCA-flash4.OLT, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland
Kryotom	Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Mikrosoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mikromanipulatoren Patch-Clamp-	SM7-Remote control system, Luigs & Neumann,

Messplatz	Feinmechanik u. Elektrotechnik GmbH, Rattingen, Deutschland
Mikroskop Patch-Clamp-Messplatz	Axioskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge	MiniStar silverline, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Patch-Clamp-Verstärker	SEC-10L, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland
Pinzetten	5/45, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland 11271-30, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenziehgerät	DMZ Universal Electrode Puller, Zeitz- Instruments Vertriebs GmbH, Martinsried Flaming/ Brown Micropipette Puller, Model P- 1000, Sutter Instrument, USA
Rasierklingen für das Vibrotom	Einweg-Rasierklingen, Wilkinson Sword, UK
Vibrotom	Microm HM 650V, Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland





## **X. DANKSAGUNG**

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka, für die Übernahme des Themas an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, die unkomplizierte Form der externen Betreuung und die hilfreiche Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Univ.-Prof. Dr. G. Schneider für die Möglichkeit die Dissertation an der Klinik für Anästhesiologie des Klinikums Rechts der Isar der TU München durchführen zu können.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern Prof. Dr. R. Haseneder und PD Dr. S. Kratzer für die freundliche Überlassung des Themas, sowie die geduldige Betreuung und Hilfestellungen in allen Belangen der Doktorarbeit. Stephan, danke für deine stets ausdauernde, engagierte Betreuung, dein persönliches Engagement, sowie deine unermüdliche Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und Mitdoktoranden danke ich für die gemeinsame Zeit und eure Hilfestellung in allen Laborangelegenheiten. Besonders Claudia und Stefan möchte ich für die Einarbeitung in wissenschaftliches Arbeiten danken und ihre stets freundliche Art bei der Beantwortung von Fragen jeglicher Art.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für ihr Vertrauen und mentale Unterstützung. Ohne euch, wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen!